

Funktionelle Charakterisierung des Tight Junction-Proteins Claudin-3 in Epithel- und Endothelzellen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Susanne Milatz

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter: 1. Prof. Dr. Michael Fromm
2. Prof. Dr. Detlev Krüger
3. Prof. Dr. Otmar Huber

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Mai 2010

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
1. Einleitung	6
1.1. Transportmechanismen an Epithelien und Endothelien	6
1.2. Die Tight Junction	7
1.2.1. Lokalisation und Funktion	7
1.2.2. Morphologie	8
1.2.3. Tight Junction-Komponenten	9
1.2.3.1. Occludin, JAM und Tricellulin.....	10
1.2.3.2. Claudine.....	11
1.3. Das Endothel.....	17
1.3.1. Struktur und Funktion	17
1.3.2. Die endotheliale Tight Junction.....	18
2. Aufgabenstellung	21
3. Material und Methoden	23
3.1. Material und Geräte	23
3.1.1. Oligonukleotide	23
3.1.2. Plasmide	23
3.1.3. Enzyme	24
3.1.4. Antikörper	24
3.1.5. Kits.....	24
3.1.6. Zelllinien.....	25
3.1.7. Chemikalien und Reagenzien.....	26
3.1.8. Standardlösungen.....	27
3.1.9. Ringer-Lösungen	30
3.1.10. Verbrauchsmaterialien.....	32
3.1.11. Laborgeräte	32
3.1.12. Software.....	34
3.2. Methoden.....	35
3.2.1. Klonierung des humanen Claudin-3-Gens.....	35
3.2.1.1. RNA-Extraktion	35
3.2.1.2. Reverse Transkription.....	35
3.2.1.3. Polymerase-Kettenreaktion.....	36
3.2.1.4. Agarose-Gelelektrophorese	37
3.2.1.5. Ligation in den Klonierungsvektor.....	37

3.2.1.6.	Transformation kompetenter Bakterienzellen	37
3.2.1.7.	Plasmid-Präparation	38
3.2.1.8.	DNA-Sequenzierung	38
3.2.1.9.	Anfügen von Restriktionssequenzen	40
3.2.1.10.	Restriktion mit Hind III oder BamH I.....	40
3.2.1.11.	Ligation in Expressionsvektoren	41
3.2.1.12.	Kolonie-PCR	42
3.2.1.13.	Anlegen von Glycerolstocks.....	43
3.2.2.	Klonierung von shRNA zur Hemmung des Claudin-3-Gens.....	44
3.2.3.	Transgene Expression in eukaryotischen Zelllinien.....	46
3.2.3.1.	Zellkultur	46
3.2.3.2.	Stabile Transfektion	47
3.2.3.3.	Selektion	47
3.2.4.	Behandlung von HUVEC mit Wandschubspannung und Hypoxie.....	48
3.2.4.1.	Isolation und Kultur von HUVEC.....	48
3.2.4.2.	Applikation von Wandschubspannung und Hypoxie.....	48
3.2.5.	Real-Time-PCR	50
3.2.6.	Western-Blotting	51
3.2.6.1.	Gesamtproteinextraktion.....	51
3.2.6.2.	Membranproteinextraktion	51
3.2.6.3.	Proteinquantifizierung	51
3.2.6.4.	SDS-PAGE	52
3.2.6.5.	Western-Blotting	52
3.2.7.	Ko-Immunpräzipitation.....	54
3.2.8.	Immunfluoreszenz und konfokale Laserscanning-Mikroskopie	54
3.2.9.	Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie	55
3.2.10.	Elektrophysiologische Methoden	56
3.2.10.1.	Ussing-Kammer-Technik	56
3.2.10.2.	Vorbereitung der Messung.....	57
3.2.10.3.	Messung von Dilutionspotentialen	58
3.2.10.4.	Messung von bionischen Potentialen.....	60
3.2.10.5.	Fluxmessungen parazellulärer Größenmarker	62
3.2.10.6.	Messung des Wasserflusses	63
3.2.10.7.	Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie.....	64
3.2.11.	Statistik	65
4.	Ergebnisse	66

4.1. Funktionelle Charakterisierung des Tight Junction-Proteins Claudin-3	66
4.1.1. Claudin-3-Überexpression oder –Defizienz in verschiedenen Zellkultursystemen	66
4.1.1.1. Überexpression von Claudin-3 in MDCK II, rbTAL und CaCo-2	67
4.1.1.2. Knock-Down von Claudin-3 in MDCK C7	68
4.1.2. Stabile Überexpression von humanem Claudin-3 in MDCK II	68
4.1.3. Analyse der Tight Junction-Ultrastruktur	71
4.1.4. Effekt auf den parazellulären und epithelialen Widerstand	75
4.1.5. Analyse der Permeabilität für Natrium und Chlorid	76
4.1.6. Analyse der Permeabilität für verschiedene Kationen und Anionen	78
4.1.7. Permeabilität für makromolekulare Marker	84
4.1.8. Messung der Permeabilität für Wasser	85
4.1.9. Interaktion von Claudin-2 und Claudin-3	86
4.2. Expression und Regulation endothelialer Tight Junction-Proteine	87
4.2.1. Expression von Tight Junction-Proteinen in HUVEC	87
4.2.2. Effekt fehlender Wandschubspannung	88
4.2.3. Analyse des Signalweges	90
4.2.4. Transkriptionelle Regulation	91
4.2.5. Effekt von Hypoxie	93
5. Diskussion	95
5.1. Funktionelle Charakterisierung des Tight Junction-Proteins Claudin-3	95
5.1.1. Eignung verschiedener Zellkultursysteme	95
5.1.2. Überexpression in MDCK II	96
5.1.3. Erhöhte Komplexität der Tight Junction-Ultrastruktur	97
5.1.4. Verminderung der Ionenpermeabilität	98
5.1.5. Abhängigkeit der Ladungsselektivität von Claudin-2	99
5.1.6. Keine Auswirkung auf die Ionenreihung	100
5.1.7. Abdichtung gegenüber Makromolekülen	101
5.1.8. Unveränderte Wasser-Permeabilität	101
5.1.9. Rolle innerhalb der Claudin-Familie	102
5.2. Expression und Regulation endothelialer Tight Junction-Proteine	105
5.2.1. Expression von Tight Junction-Proteinen in HUVEC	105
5.2.2. Abdichtung der Tight Junction bei fehlender Wandschubspannung	105
5.2.3. Unterschiedliche Regulation der Tight Junction-Komponenten	106
5.2.4. Hochregulation von Claudin-3 bei Hypoxie	107
5.2.5. Bedeutung in Physiologie und Pathophysiologie	108

6. Zusammenfassung	109
Abkürzungsverzeichnis	111
Literaturverzeichnis	114
Verzeichnis der eigenen Publikationen.....	124
Danksagung.....	125

1. Einleitung

1.1 Transportmechanismen an Epithelien und Endothelien

In vielzelligen Organismen müssen Organe und Gewebe gegeneinander und von der äußeren Umgebung abgegrenzt werden. Diese Funktion übernehmen Epi- und Endothelien. Epithelien sind ein- oder mehrlagige Zellschichten, die äußere Körperoberflächen bedecken oder die Innenräume von Organen wie Darm, Niere oder Lunge auskleiden und so physiologische Grenzen zwischen einer mit dem Außenraum verbundenen Lumenseite (apikal) und der Gewebeseite (basolateral) bilden. Durch die Basallamina, eine aus einer Proteinschicht bestehenden spezialisierten extrazellulären Matrix, wird das Epithel von dem darunter liegenden Bindegewebe abgegrenzt. Endothelien kleiden den Innenraum der Blut- und Lymphgefäße aus und übernehmen hier die Funktion einer Barriere zwischen Blut- bzw. Lymph- und Gewebeseite. Epi- und Endothelien bilden selektive Grenzen und regulieren so den Transport von Wasser, Ionen und größeren Soluten.

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen transzellulären Transportprozessen, bei denen Moleküle die Zellmembran passieren und über den Transport durch die Zelle hindurch die Gewebeseite erreichen, und dem parazellulären Transport, bei dem die Passage durch den Interzellularspalt, also den Raum zwischen den Zellen erfolgt. Transzellulärer Transport kann passiv, also entlang des elektrochemischen Gradienten, erfolgen (über Kanäle, Carrier oder durch die Lipidphase der Zellmembran) oder aktiv entgegen einem Gradienten unter Verbrauch von Stoffwechselenergie stattfinden (z.B. Kalium-Natrium-Pumpe). Einen weiteren transzellulären Weg stellt die Transzytose dar, bei der Partikel an die Zellmembran binden, durch Einstülpung umschlossen und nach innen abgeschnürt werden. Auf der anderen Seite der Zelle kann das Molekül nach demselben Prinzip nach außen gelangen.

Anders als der transzelluläre Transport ist der parazelluläre Transport stets passiv und diskriminiert nach bisheriger Kenntnis nicht zwischen beiden Transportrichtungen. Er folgt elektrochemischen Gradienten, welche oft durch transzelluläre Prozesse geschaffen und aufrecht erhalten werden. Die Regulation des parazellulären Transports erfolgt durch die apikale Schlussleiste oder Tight Junction. Obwohl der parazelluläre Durchtritt im Vergleich mit dem transzellulären Transport weniger spezifisch erfolgt, ist die Passage durch die Tight Junction durch definierte Ladungs- und Größenselektivität gekennzeichnet.

Ein wesentliches Maß für die pauschale Dichtheit einer Zellschicht ist der elektrische trans-epitheliale Widerstand (R^t bzw. TER in $\Omega \cdot \text{cm}^2$), der durch die Passage von Ionen durch das Epi- oder Endothel bestimmt wird.

Hiervon zu unterscheiden ist der Begriff "Leckheit". Ein Epithel gilt dann als "leck", wenn sein parazellulärer Widerstand (R^{para}) kleiner ist als der transzelluläre Widerstand (R^{trans}) und im umgekehrten Fall als "dicht". R^{para} ist umgekehrt proportional zur Ionenpermeabilität der Tight Junction, die sich in unterschiedlichen Epithelien erheblich unterscheiden und sich – insbesondere unter pathologischen Bedingungen – dramatisch verändern kann.

1.2 Die Tight Junction

1.2.1. Lokalisation und Funktion

Die Tight Junction (*Zonula occludens*, Schlussleiste) ist der am meisten apikal gelegene Teil der Grenze zwischen benachbarten Zellen und bildet eine selektive Barriere für den Transport von Wasser, Ionen und größeren Molekülen (Gate-Funktion, Abb. 1). Darüber hinaus sorgt sie für die Aufrechterhaltung der Zellpolarität, also der Differenzierung in apikale und basolaterale Seite, indem sie die Diffusion von Kanälen, Carriern und Rezeptoren innerhalb der Plasmamembran verhindert (Fence-Funktion). Die weiter basal lokalisierten Komponenten des Interzellularkomplexes übernehmen Funktionen der Zelladhäsion (Adherens Junction und Desmosomen) und des Stoffaustausches zwischen benachbarten Zellen (Gap Junctions).

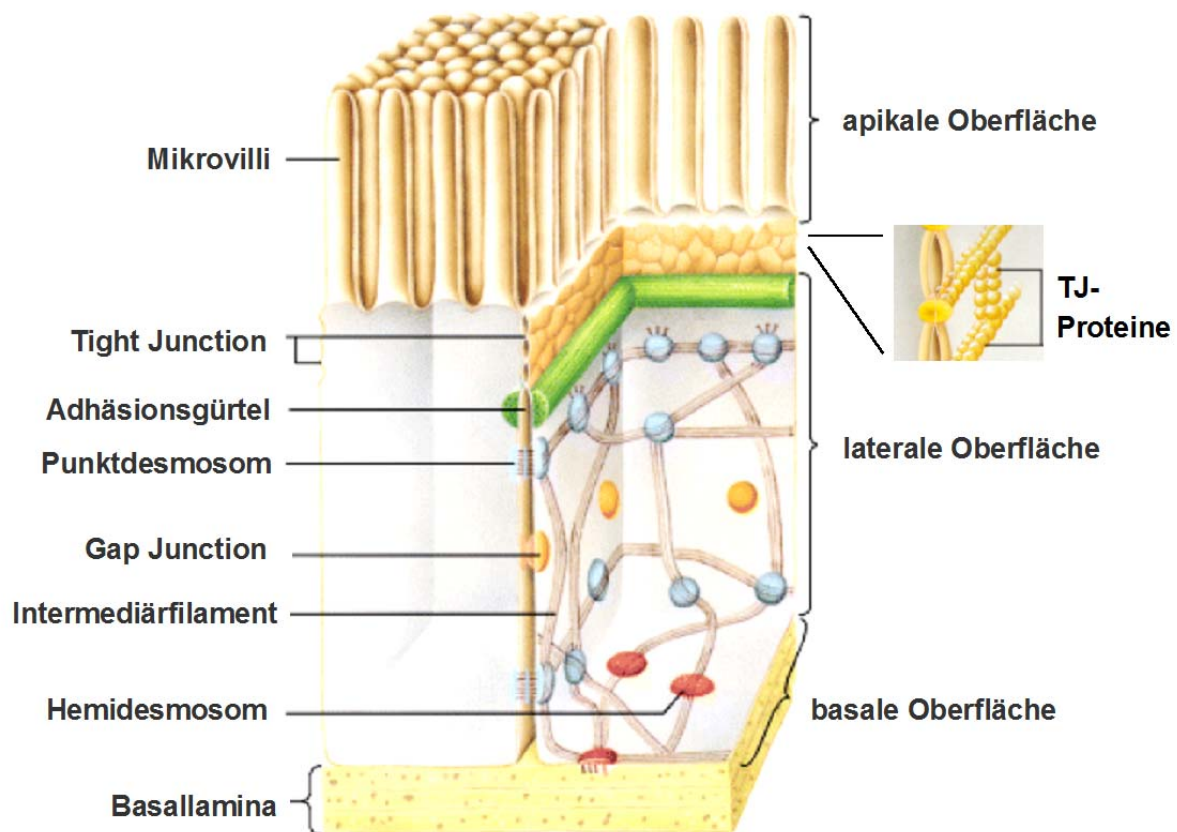


Abb. 1: Schematische Darstellung der Zellverbindungsproteine am Beispiel des Darmepithels. Die Tight Junction bildet den am weitesten apikal gelegenen Teil des Schlussleistenkomplexes und limitiert die parazelluläre Passage von Soluten. Nach Material aus www.meduniwien.ac.at.

1.2.2. Morphologie

Die Darstellung von Zell-Zell-Grenzen mittels Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie zeigt die Tight Junction als ein mehr oder weniger kontinuierliches, die Zelle auf der apikalen Seite gürtelartig umfassendes Netzwerk von intramembranären Partikeln (Staehelin, 1973; Tsukita und Furuse, 1999; Abb. 2). Dabei sind die Tight Junction-Stränge in der Membran einer Zelle lateral mit Strängen in der Membran der benachbarten Zelle assoziiert und bilden so paarige Stränge (Sasaki et al., 2003).

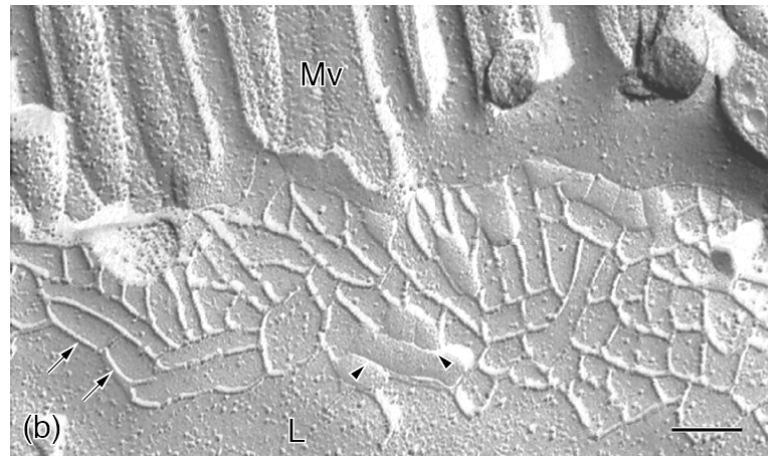


Abb. 2: Gefrierbruch-elektronenmikroskopische Aufnahme von Epithelzellen des Mäusedarms (Tsukita & Furuse, 1999). Zwischen den apikalen Mikrovilli (Mv) und der lateralen Membran (L) erscheint die Tight Junction als Netzwerk kontinuierlicher Stränge auf der protoplasmatischen Seite (Pfeile) und als komplementäre Mulden auf der exoplasmatischen Seite (Pfeilspitzen). Der Balken entspricht 0,2 μm .

1.2.3. Tight Junction-Komponenten

An der Aufrechterhaltung einer intakten Funktion der Tight Junction sind verschiedene Proteine beteiligt, die man ihrer Struktur und Funktion gemäß grob in verschiedene Gruppen unterteilen kann: Die erste Gruppe bilden Proteine, die die Zellmembran durchspannen und über die Zellgrenze hinweg mit Membranproteinen einer benachbarten Zelle interagieren (*trans*-Interaktion). Zu dieser Gruppe der Transmembranproteine gehören Occludin, das junctionale Adhäsionsmolekül (JAM), Tricellulin sowie die Familie der Claudine. Bisher konnte für keines dieser integralen Membranproteine die vollständige Röntgen-Kristall-Struktur ermittelt werden.

Eine weitere Gruppe von Proteinen verbindet die Transmembranproteine mit dem Aktin-Zytoskelett und fungiert als Angriffspunkt für Signaltransduktionswege. Diese Gruppe beinhaltet beispielsweise die *Zonula occludens*-Proteine ZO-1, -2 und -3 und das *multi-PDZ domain protein* MUPP-1. Diese Proteine sind in der Regel über Interaktionsdomänen, sogenannte PDZ-Domänen, an C-terminal gelegene PDZ-Bindemotive integraler Membranproteine gebunden.

Eine dritte zum Tight Junction-Komplex gehörige Gruppe beinhaltet Moleküle mit Signalfunktion wie Transkriptionsfaktoren, Kinasen oder Phosphatasen, die für die Regulation der eigentlichen Tight Junction-Proteine verantwortlich sind.

1.2.3.1. Occludin, JAM und Tricellulin

Occludin (von *occludere* = schließen) wurde 1993 als erstes transmembranäres Tight Junction-Protein identifiziert (Furuse et al., 1993). Es handelt sich um ein etwa 65 kDa großes Protein, dass viermal die Zellmembran durchspannt und dadurch zwei extrazelluläre Loops bildet. Amino- und Carboxy-Terminus sowie ein kurzer Loop sind im Zytosol lokalisiert (Abb. 3). Die funktionelle Bedeutung von Occludin ist bislang nicht vollständig geklärt: Seine Überexpression in Säugetier-Epithelzellen führte zu einem Anstieg des transepithelialen Widerstandes (R^t), gleichbedeutend mit einer Abdichtung der Tight Junction gegenüber Ionen (Balda et al., 1996; McCarthy et al., 1996). Andererseits führten Knock-out-Experimente an embryonalen Stammzellen zu keinerlei Störungen bei der Differenzierung in polarisierte Zellen oder Perturbation der parazellulären Barriere. Die Analyse der Tight Junction-Morphologie mittels Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie ergab intakte Strangmuster, so dass davon auszugehen ist, dass Occludin für die Entwicklung von Tight Junction-Strängen nicht essentiell ist (Saitou et al., 1998). Occludin-defiziente Mäuse zeigten einen komplexen Phänotyp mit Wachstumsretardation, Sterilität der Männchen, chronischer Inflammation, Verlust der Belegzellen des Magens und verminderter Säuresekretion, wobei aber keine strukturellen oder funktionellen Auffälligkeiten der Tight Junction beobachtet wurden (Saitou et al., 2000; Schulzke et al., 2005). In Knock-down-Studien an MDCK II-Zellen trat eine Verminderung der Zytoskelett-vermittelten Apoptoserate auf (Yu et al., 2005). Insgesamt geht man von einer hauptsächlich regulatorischen Funktion von Occludin aus.

Die Gruppe der JAM-Proteine gehört zur IgG-Superfamilie und ist durch zwei extrazelluläre Domänen, eine Transmembrandomäne sowie einen kurzen intrazellulären Carboxy-Terminus mit PDZ-Bindemotiv gekennzeichnet (Martin-Padura et al., 1998; Abb. 3). JAM-1 wird sowohl in epithelialen als auch in endothelialen Zellen exprimiert, wo es den parazellulären Durchtritt von Monozyten erleichtert (Kostrewa et al., 2001). JAM-2 kommt in endothelialen Zellen vor (Aurand-Lions et al., 2001), während JAM-3 auf T-Zellen lokalisiert ist, wo es eine Rolle bei der Lymphozyten-Migration zwischen Endothelzellen spielt (Palmeri et al., 2000; Cunningham et al., 2000; Arrate et al., 2001). JAM-4 ist im Glomerulus der Niere sowie in intestinalen Epithelzellen nachgewiesen worden (Hirabayashi et al., 2003).

Bei dem erst kürzlich entdeckten Tricellulin handelt es sich um ein ca. 65 kDa großes Protein, dass vier Transmembrandomänen besitzt und im C-Terminus Ähnlichkeit mit Occludin zu haben scheint (Ikenouchi et al., 2005; Abb. 3). Es ist bevorzugt an trizellulären Kontaktstellen lokalisiert und dichtet den sog. *central tube*, der sich an diesen Punkten befindet, gegen die Passage von Makromolekülen ab (Krug et al., 2009).

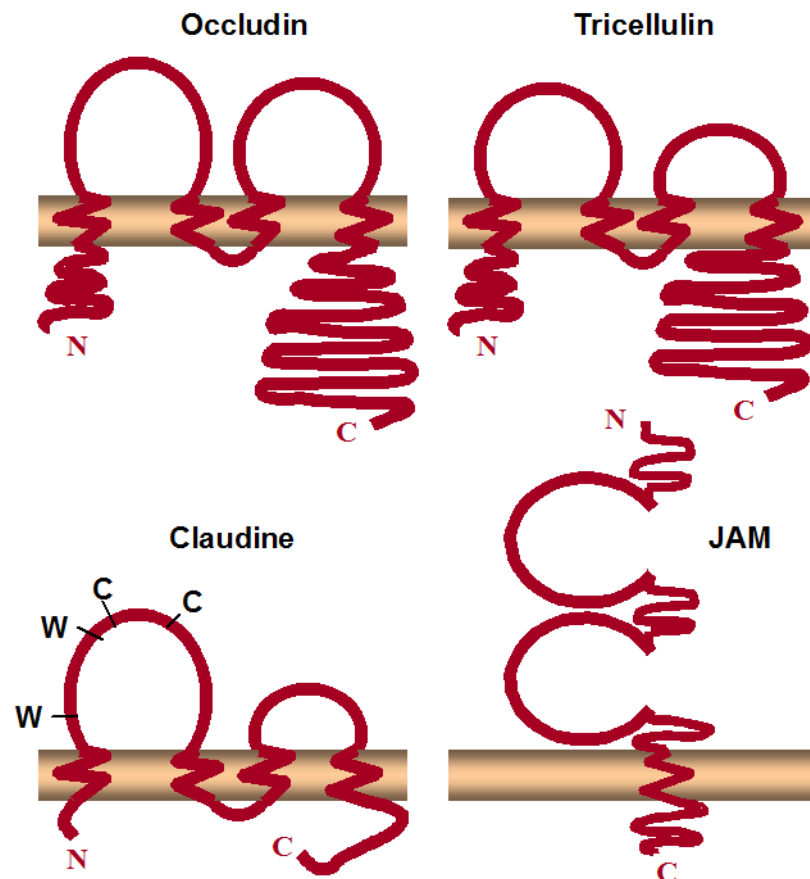


Abb. 3: Verschiedene Transmembranproteine der Tight Junction. Occludin und Tricellulin kommen in verschiedenen Splice-Varianten vor, von denen nicht alle in der Tight Junction lokalisiert sind. Die Permeabilitätseigenschaften der Tight Junction hängen im wesentlichen von der Expression von Claudinen ab, die die größte Gruppe (24 Mitglieder bei Mammalia) der Tight Junction-Komponenten bilden. Auch die Gruppe der JAM-Proteine besteht aus mehreren Mitgliedern unterschiedlicher Funktion.

1.2.3.2. Claudine

Die ersten Claudine wurden im Jahr 1998 identifiziert (Furuse et al., 1998), was bald zu der Erkenntnis führte, dass eine ganze Reihe der zur Claudin-Familie gehörigen Proteine bereits kloniert und unter anderen Namen bekannt waren (Morita et al., 1999). Bis heute sind bei Säugetieren 24 verschiedene Mitglieder der Familie der Claudine (von lat. *claudere* = schließen) identifiziert worden. Sie sind mit einem Molekulargewicht von 20-36 kDa deutlich kleiner als die anderen transmembranären Tight Junction-Proteine und teilen mit ihnen keinerlei Sequenzhomologie.

Claudine verfügen über vier Transmembrandomänen, wobei sie einen größeren ersten (ECL-1, ca. 53 Aminosäuren) und einen kleineren zweiten extrazellulären Loop (ECL-2, 16-33 Aminosäuren) ausbilden. N- und C-Terminus befinden sich im Zytoplasma. Der erste

extrazelluläre Loop enthält geladene Aminosäuren und bestimmt die Ladungsselektivität eines Claudins, also die Eigenschaft, den selektiven Durchtritt einer bestimmten Ionensorte zu ermöglichen. Allen Claudinen gemein ist das WWCC-Motiv im ECL-1.

Durch Expression in Tight Junction-freien Zellen konnte für eine Reihe von Claudinen gezeigt werden, dass sie in der Lage sind, autonom Tight Junction-Stränge zu bilden (Furuse et al., 1998; Furuse et al., 1999; Morita et al., 1999; Morita et al., 2002; Coyne et al., 2003; Miyamoto et al., 2005; Van Itallie et al., 2005; Nunes et al., 2006). Die Fähigkeit der Claudine zur Ausbildung von Strängen beruht auf ihrer Interaktionsfähigkeit. Dabei unterscheidet man zwischen der Wechselwirkung mit Transmembranproteinen derselben Zelle (auch Oligomerisation oder *cis*-Interaktion) und der Assoziation mit Proteinen der Nachbarzelle (*trans*-Interaktion; Abb. 4). Weiterhin differenziert man zwischen der homophilen Interaktion (zwischen gleichen Claudinen) und der heterophilen Interaktion (zwischen verschiedenen Claudinen). Die bei den verschiedenen Claudinen unterschiedlich ausgeprägte Fähigkeit zur Interaktion beruht vermutlich in erster Linie auf der Struktur der extrazellulären Loops, wobei auch andere Domänen eine Rolle spielen können (Daugherty et al., 2007; Piontek et al., 2008).

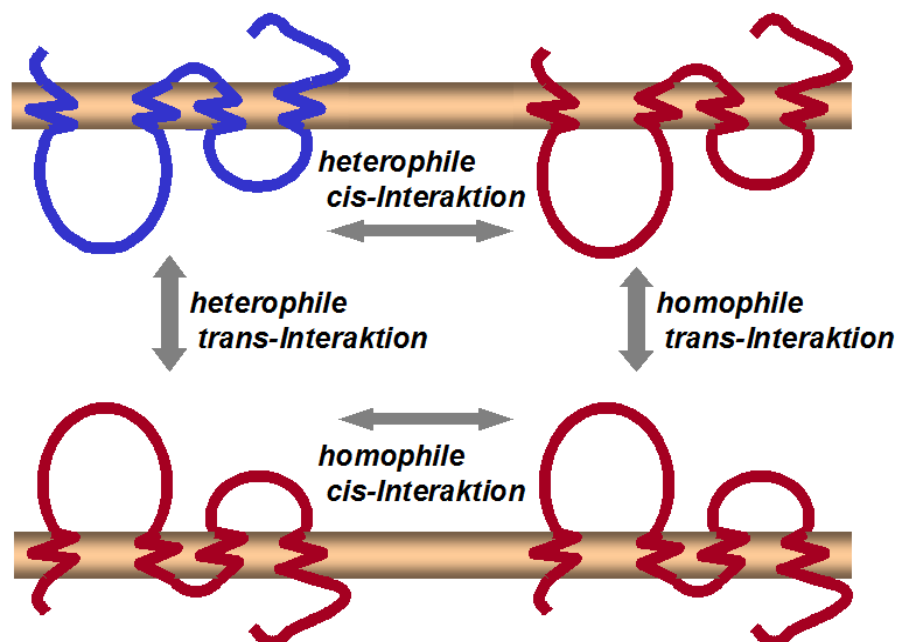


Abb. 4: Mögliche Interaktionsformen zwischen Claudinen. Interaktionen zwischen benachbarten Claudinen derselben Zelle bezeichnet man als *cis*-Interaktion oder Oligomerisation, Interaktionen mit der Nachbarzelle als *trans*-Interaktion. Homophile Interaktionen finden zwischen gleichen Claudinen statt, als heterophil bezeichnet man Interaktionen mit einem anderen Mitglied der Claudin-Familie.

Der C-Terminus divergiert innerhalb der Claudin-Familie bezüglich Länge und Sequenz und ist vermutlich wesentliche Zielstruktur für aus dem Zytosol ankommende Signalwege. Er enthält verschiedene Phosphorylierungsstellen und bei den meisten Claudinen ein PDZ-Bindemotiv, durch welchen sie an Proteine mit PDZ-Domäne wie ZO-1, -2 oder -3 gebunden und so mit dem Zytoskelett verankert sind.

Die parazellulären Eigenschaften von Epi- und Endothelien beruhen in erster Linie auf der selektiven Expression und Kombination verschiedener Claudine mit spezifischen Eigenschaften. Demzufolge ist die Verteilung unterschiedlicher Claudine innerhalb der Organe nicht zufällig, sondern folgt einem gewebsspezifischen Expressionsmuster.

Während man zunächst annahm, dass alle Claudine die Tight Junction mehr oder weniger abdichten, ist inzwischen bekannt, dass einige Claudine auch als parazelluläre Poren fungieren und nach Überexpression den selektiven Durchtritt von Ionen durch die Tight Junction erhöhen können (Simon et al., 1999; Furuse et al., 2001; Amasheh et al., 2002; Hou et al., 2005; Kausalya et al., 2006; Van Itallie et al., 2006; Günzel et al., 2009). Im folgenden sollen Expression und Funktion einiger Claudine näher besprochen werden. Abb. 5 zeigt den phylogenetischen Baum der Claudin-Familie beim Menschen.

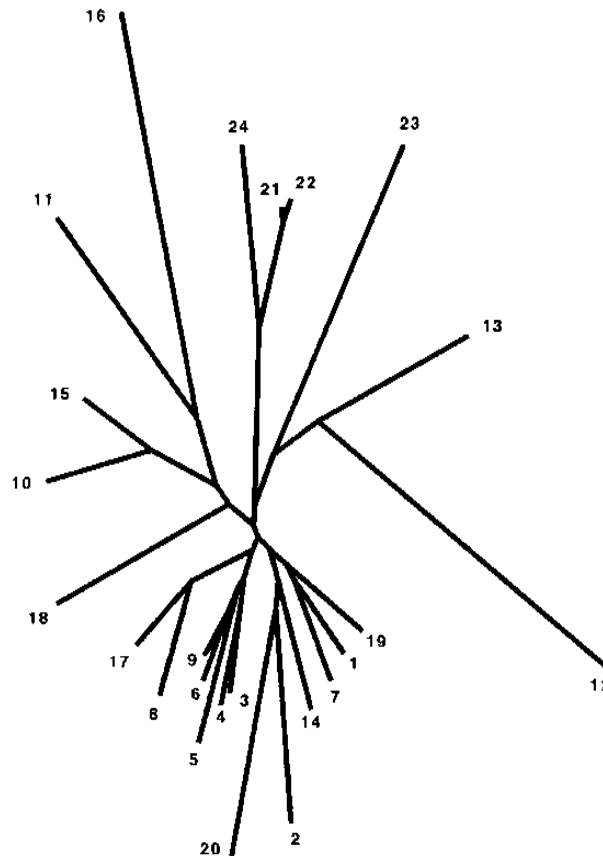


Abb. 5: Phylogenetische Analyse der Claudin-Familie ausgehend von den menschlichen Aminosäure-Sequenzen. Claudin-13 konnte beim Menschen nicht nachgewiesen werden; die verwendete Sequenz entstammt der Maus. Nach Katoh et al., 2003.

Claudin-1

Claudin-1 gehört zu den ersten identifizierten und weit verbreiteten Claudinen (Furuse et al., 1998; Kiuchi-Saishin et al., 2002). Es kommt typischerweise in dichten Epithelien wie der Epidermis, dem distalen Nephron oder der Gallenblase, aber auch im Innenohr, dem ovariellen Epithel und im Endothel der Hirnkapillaren vor. Seine Überexpression in einer Nierenepithel-Zelllinie führte zu einer verstärkten Abdichtung der Tight Junction. Experimente mit Claudin-1-defizienten Mäusen zeigten eine essentielle Bedeutung für den Wasserhaushalt; die Tiere starben innerhalb von Stunden nach der Geburt an massivem Wasserverlust über die Haut (Furuse et al., 2002). Claudin-1 ist zur *trans*-Interaktion mit Claudin-3, nicht aber mit Claudin-2 oder -4 in der Lage. Es spielt eine bedeutende Rolle beim NISCH-Syndrom (*neonatal ichthyosis-sclerosing cholangitis syndrome*), einer seltenen autosomal-rezessiven Erkrankung, bei der Mutationen im Claudin-1-Gen zu trunkierten Proteinen führen. In der Folge treten Ichthyose (Verhornungsstörung der Haut), Hypotrichose

der Kopfhaut (Haarausfall) und sklerosierende Cholangitis (Entzündung der Gallenwege) auf (Hadj-Rabia et al., 2004; Feldmeyer et al., 2006). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Expression von Claudin-1 während der Entstehung verschiedener Tumoren verändert ist (Übersicht bei Morin, 2005).

Claudin-2

Claudin-2 wird typischerweise in lecken Epithelien wie den Darmkrypten oder dem proximalen Nierentubulus exprimiert und gehört eindeutig zu den porenbildenden Claudinen. Bei Überexpression in dichten Nierenepithel-Zelllinien verringert es den transepithelialen Widerstand, indem es selektive Poren für kleine Kationen in Tight Junction-Strängen ausbildet (Furuse et al., 2001; Amasheh et al., 2002). Eine Erhöhung der Permeabilität für größere Moleküle konnte hingegen nicht beobachtet werden. Claudin-2 ist in der Lage, *in cis* sowie *in trans* mit Claudin-3 zu interagieren (Furuse et al., 1999). Chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie *Morbus Crohn* und *Colitis ulcerosa* sind mit verstärkter Expression von Claudin-2 assoziiert (Heller et al., 2005; Zeissig et al., 2007), wo es durch proinflammatorische Zytokine hochreguliert wird.

Claudin-3

Claudin-3 wurde erstmals 1991 als *rat ventral prostate protein 1* (RVP1) kloniert und 1997 als Rezeptor für das *Clostridium perfringens*-Enterotoxin (CPE) erkannt (Briehl & Miesfeld, 1991; Katahira et al., 1997 a, b). 1999 wurde es als drittes Mitglied der Claudin-Familie identifiziert (Morita et al., 1999). Trotz seines ubiquitären Vorkommens in Darm, Niere, Gallenblase, Innenohr, Leber und anderen Epithelien, wird es verstärkt in den dichteren distalen und schwächer in den lecken proximalen Segmenten von tubulären Strukturen wie Darm und Nephron sowie in der sehr dichten Bluthirnschranke exprimiert (Rahner et al., 2001; Kiuchi-Saishin et al., 2002; Wolburg et al., 2003).

Die Funktion von Claudin-3 ist bisher nicht vollständig verstanden. Erste experimentelle Ansätze weisen auf eine eher abdichtende Funktion in der Tight Junction hin. Claudin-3 ist zu vielfältigen heterophilen Interaktionen imstande. So sind *cis*-Interaktionen mit Claudin-2 und -4 sowie *trans*-Interaktionen mit Claudin-1, -2 und -5 beschrieben worden (Furuse et al., 1999; Coyne et al., 2003; Daugherty et al., 2007). Der zweite extrazelluläre Loop trägt eine Bindestelle für das *Clostridium perfringens*-Enterotoxin. Die Bindung (z.B. im Rahmen einer Lebensmittelvergiftung) führt zur Zellyse und Schädigung der Darmbarriere, die mit starker Diarrhö assoziiert ist (Katahira et al., 1997). Die Claudin-3-Expression ist während der Entwicklung verschiedener Tumoren deutlich reguliert, dazu gehören Tumoren der Brust, der

Ovarien, des Uterus, der Prostata und des Ösophagus (Morin, 2005; Hewitt et al., 2006). Bei der Entstehung des *Glioblastoma multiforme* führt ein selektiver Verlust von Claudin-3 zur Destabilisierung der Tight Junction (Wolburg et al., 2003).

Claudin-4

Claudin-4 gehört ebenfalls zu den in vielen Organen und Geweben exprimierten Tight Junction-Proteinen. Überexpressionsstudien an Zellen des Nierenepithels und der Submandibulardrüse zeigten eine Erhöhung des transepithelialen Widerstandes unter Claudin-4-Expression, die durch eine selektive Abdichtung gegenüber Kationen verursacht wurde (Van Itallie et al. 2001, Michikawa et al., 2008). Außerdem verringerte Claudin-4 den Durchtritt von sehr großen Makromolekülen (70 kDa), kaum aber die Passage von Molekülen kleineren Molekulargewichts (4 kDa). Es zeichnet sich weiterhin durch eine sehr hohe Sequenzhomologie mit Claudin-3 aus (Abb. 5), welche die CPE-Bindestelle einschließt.

Anders als für Claudin-3 konnten für Claudin-4 keine heterophilen *trans*-Interaktionen mit den Claudinen -1, -3 oder -5 nachgewiesen werden (Daugherty et al., 2007). In vielen Tumoren wird eine gemeinsame Regulation von Claudin-3 und Claudin-4 beobachtet (Honda et al., 2006; Honda et al., 2007; Satake et al., 2008; Morin, 2005).

Claudin-5

Claudin-5 galt ursprünglich als ein typisch endotheliales Protein, bis seine Expression in Epithel-Zelllinien nachgewiesen wurde (Amasheh et al., 2005). In Überexpressionsstudien an Nierenepithel- und Kolonkarzinom-Zelllinien sowie in Experimenten am Knock-out-Mausmodell ist es als ein die Tight Junction abdichtendes Protein beschrieben worden, das den Durchtritt von Molekülen bis zu einer Größe von 800 Da hemmt (Nitta et al., 2003; Amasheh et al., 2005). In Gehirn-Endothelzellen führte die Inhibition von Claudin-5 durch RNA-Interferenz zu einer Reduktion des transendothelialen Widerstandes (Koto et al., 2007). Bisher konnten für Claudin-5 *trans*-Interaktionen mit Claudin-3 nachgewiesen werden. Im Verlauf chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen wurde eine Herunterregulation von Claudin-5 beobachtet (Zeissig et al., 2007).

Claudin-11

Claudin-11 wurde ursprünglich als Oligodendrozyten-spezifisches Protein (OSP) beschrieben und kommt hauptsächlich in der Myelinscheide der Oligodendrozyten im Gehirn, aber auch in Sertoli-Zellen des Hodens, in der *Stria vascularis* des Innenohrs und in der Niere vor. Seine Defizienz in Mäusen führte zu Taubheit (Gow et al., 2004). Claudin-11 ist

bisher als abdichtendes Tight Junction-Protein beschrieben worden. Seine Überexpression in Zellen des Nierenepithels bewirkte eine Erhöhung des transepithelialen Widerstandes, die auf einer selektiven Abdichtung gegenüber Kationen beruhte (Van Itallie et al., 2003). Kürzlich wurde gezeigt, dass Claudin-11 in verschiedenen Endothel-Zelllinien exprimiert ist und dass ein selektiver Knock-down in einem Zellkulturmodell des *Corpus cavernosum* (HCCEC) zu einer Verminderung des transendothelialen Widerstandes führte (Wessells et al., 2009). Über mögliche Interaktionen mit anderen Claudinen liegen bisher keine Erkenntnisse vor.

Claudin-23

Claudin-23 ist erst 2003 entdeckt worden. Seine Funktion ist bislang ungeklärt. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass seine Expression während der Entwicklung von Tumoren verändert ist (Katoh et al., 2003).

1.3 Das Endothel

1.3.1. Struktur und Funktion

Endothelien kleiden als einzellige Schichten die Innenseiten von Blut- und Lymphgefäßen aus und erfüllen vielfältige Funktionen: Neben der Regulation des Stoffaustausches zwischen Blut und Gewebe steuern sie Blutdruck, Blutgerinnung, Entzündungsprozesse bei Infektionen sowie die Sprossung neuer Blutgefäße (Angiogenese). Während die Wand von Kapillaren typischerweise von einzelnen, das Lumen umschließenden Endothelzellen gebildet wird, sind bei größeren Gefäßen mehrere Zellen beteiligt. Endothelien stehen unter starkem Einfluss biomechanischer Faktoren wie Wandbewegung und Strömungsverhalten des Blutflusses. Zudem üben physiologische Parameter wie der Sauerstoffpartialdruck einen bedeutenden regulatorischen Einfluss aus. Endotheliale Dysfunktionen spielen eine wesentliche Rolle bei pathologischen Zuständen wie Ödemen, Atherosklerose und Diabetes-assoziierten Gefäßkrankheiten.

Die Aufrechterhaltung der physiologischen Permeabilität eines Endothels ist Voraussetzung einer normalen Organfunktion. Dementsprechend können Störungen der Durchlässigkeit zur pathologischen Veränderung von Organen und Geweben führen. Wie auch beim Epithel sind sowohl trans- als auch parazelluläre Transportwege an der Permeation von Wasser und Soluten beteiligt. Beispielsweise sind verschiedene transzelluläre Carrier für den Transport von Aminosäuren und Glukose verantwortlich. Weiterhin exprimieren Endothelzellen diverse

Ionenkanäle, die die Produktion und Freisetzung vasoaktiver und hämostatischer Faktoren sowie Zellproliferation und Angiogenese regulieren. Außerdem stellen Ionenkanäle ein Bindeglied zwischen den beiden Transportwegen dar. Durch Regulation des Kalzium-Spiegels können sie beispielsweise Kalzium-abhängige Zellverbindungen und somit die Integrität der parazellulären Barriere beeinflussen. Zudem findet eine Reihe vesikelvermittelter Transportvorgänge statt, die beispielsweise für den Durchtritt von Albumin verantwortlich sind.

Die Regulation der parazellulären Permeabilität obliegt der endothelialen Tight Junction, die sich hinsichtlich ihrer Komponenten und Eigenschaften von der epithelialen Schlussleiste unterscheidet.

1.3.2. Die endotheliale Tight Junction

Verglichen mit der epithelialen Tight Junction ist die endotheliale Tight Junction im allgemeinen deutlich durchlässiger, wobei wesentliche Unterschiede zwischen verschiedenen Endothelien bestehen (Abb. 6). Je nach Dichtheit kann man grob drei verschiedene Formen von Endothelien unterscheiden: diskontinuierliche, fenestrierte und kontinuierliche Endothelien. Bei diskontinuierlichen Endothelien fehlt teilweise der Zell-Zell-Kontakt zwischen den einzelnen Endothelzellen. Dementsprechend sind sie sehr durchlässig und ermöglichen die Passage größerer Moleküle und sogar Zellen. Die Basalmembran ist nicht oder nur teilweise existent. Diskontinuierliche Endothelien kommen in Leber, Milz und Knochenmark vor. Anders als das diskontinuierliche Endothel besitzt das fenestrierte Endothel eine kontinuierliche Basalmembran. Der parazelluläre Weg ist relativ weit geöffnet und bildet mit sogenannten Diaphragmata versehene „Fenster“, so dass der Durchtritt größerer Moleküle teilweise ermöglicht wird. Beispiele finden sich in Blutgefäßen des Darms und der Nierenglomeruli. Das kontinuierliche Endothel besitzt hingegen eine stark ausgeprägte Tight Junction, die den parazellulären Stofftransport selektiv reguliert, und ist dementsprechend verhältnismäßig undurchlässig für im Blut gelöste Stoffe. Es tritt vor allem in der Blut-Hirn-Schranke auf.

Die Zusammensetzung der Tight Junction aus bestimmten Komponenten bedingt ihre spezifische ultrastrukturelle Morphologie, welche mittels Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie visualisiert werden kann. Dabei erlauben Komplexität der Stränge und Assoziation mit der protoplasmatischen (P-face) oder der exoplasmatischen Membranseite (E-face) Rückschlüsse auf die Dichtheit. Im allgemeinen geht ein komplexes Strangmuster, das hauptsächlich mit dem P-face assoziiert ist, mit einer hohen Dichtheit einher und umgekehrt.

Während epitheliale Tight Junctions in der Regel aus komplexen Strängen bestehen, die mit dem P-face assoziiert sind und komplementäre „Furchen“ auf dem E-face bilden, sind endotheliale Tight Junctions fast vollständig mit dem E-face assoziiert. Eine Ausnahme bilden die eher dichten Tight Junctions der Blut-Hirn-Schranke, die etwa zur Hälfte mit dem P-face assoziiert sind (Wolburg et al., 2009). Auch die Komplexität der Stränge ist hier deutlich höher als bei Endothelien, die nicht der Blut-Hirn-Schranke angehören.

Weiterhin unterscheiden sich epitheliale und endotheliale Tight Junctions hinsichtlich ihrer Zusammensetzung. Die Hauptkomponenten fast aller endothelialen Tight Junctions sind Occludin, JAM-1 und Claudin-5 (Hirase et al., 1997; Morita et al., 1999; Liebner et al., 2000; Leach et al., 2000). Darüber hinaus sind verschiedene Endothelien durch die Expression unterschiedlicher Claudine charakterisiert, dazu gehören Claudin-1, -3 und -11 (Liebner et al., 2000; Lippoldt et al., 2000; Wolburg et al., 2003; Challier et al., 2005; Lievano et al., 2006; Enerson et al., 2006; Wessells et al., 2009). Auch Tricellulin konnte in der Endothel-Zelllinie HUVEC nachgewiesen werden (Krug et al., 2009).

Anders als die Tight Junction ist die Adherens Junction in Endothelien ubiquitär vorhanden. Ihre Hauptkomponente ist zelltypspezifisches VE-Cadherin (*vascular endothelial cadherin*), dessen Fehlen die Dichtheit des Endothels negativ beeinflussen kann (Corada et al., 1999; Corada et al., 2001). Dieser Effekt scheint besonders in lecken Endothelien mit sehr schwach ausgebildeter Tight Junction ausgeprägt zu sein. Darüber hinaus ist kürzlich gezeigt worden, dass VE-Cadherin an der transkriptionellen Regulation von Claudin-5 beteiligt ist (Taddei et al., 2008).

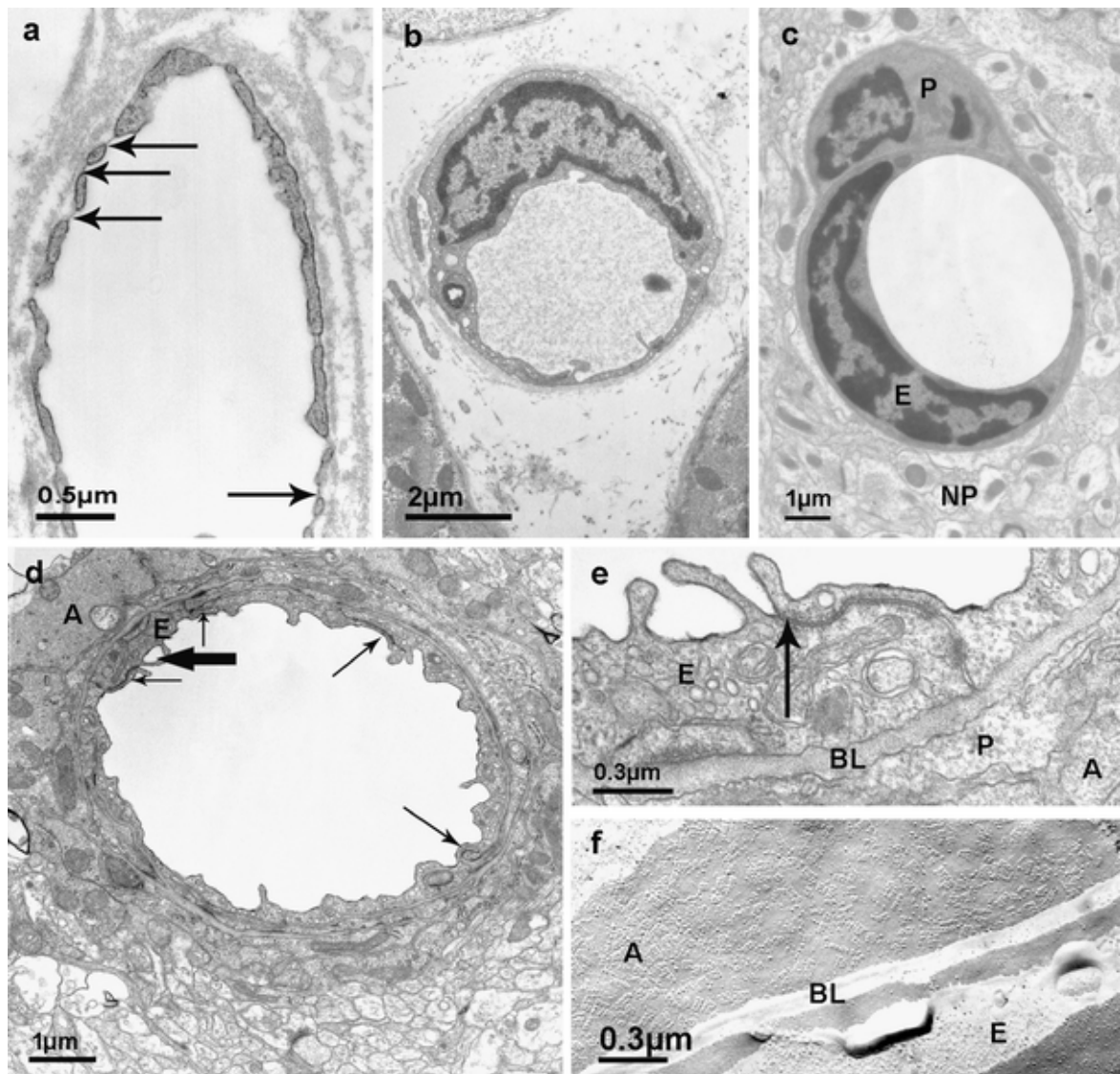


Abb. 6: Elektronenmikroskopische Aufnahmen verschiedener Blutgefäße. *a* Fenestrierte Kapillare der Choroidalgefäße des murinen Auges. Das Gefäß enthält eine dicke Basallamina (Pfeile zeigen Fenestrierungen). *b* Muskelkapillare aus einer humanen Biopsie. Die Kapillare ist kontinuierlich, der Raum zwischen Kapillare und Muskelzelle ist relativ groß. *c* Gehirnkapillare der Maus (E Endothelzelle, P Perizyte). Die Kapillare ist kontinuierlich und in das Neuropil (NP) integriert. *d* Großes Gefäß, dessen Umfang durch mehrere Endothelzellen (E) gebildet wird; (kleine Pfeile zeigen Tight Junctions zwischen Endothelzellen, A = Astrozyte). *e* Vergrößerter Ausschnitt von *d*. Gezeigt ist eine Tight Junction (Pfeil) zwischen Endothelzellen (BL = Basallamina). *f* Gefrierbruch-elektronenmikroskopische Aufnahme einer Astrozytenmembran (A) des murinen Hirns (BL = Basallamina, E = Endothelzelle), aus Wolburg et al., 2009.

2. Aufgabenstellung

Eine essentielle Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der Funktion von Organen und Geweben ist das Wirken von Epi- und Endothelien als selektive Barrieren innerhalb des Körpers, welches maßgeblich durch die molekulare Zusammensetzung der Tight Junction bestimmt wird. Nach derzeitigem Erkenntnisstand bildet die Familie der Claudine den größten und bedeutsamsten Bestandteil der apikalen Schlussleiste. Während einige Claudine bereits gut hinsichtlich ihrer Funktion untersucht sind, ist die Aufgabe anderer noch unklar.

Das Hauptziel dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung des Tight Junction-Proteins Claudin-3, welches als eines der ersten Komponenten der Tight Junction entdeckt wurde und ubiquitär exprimiert ist. Darüber hinaus gehört es zur relativ kleinen Gruppe derjenigen Claudine, die in endothelialen Tight Junctions enthalten und für dessen Funktion essentiell sind (Wolburg et al., 2003). Obwohl erste experimentelle Ansätze auf eine eher abdichtende Rolle von Claudin-3 innerhalb der Tight Junction hinweisen, konnte bislang keine eindeutige Aussage hinsichtlich seiner Funktion getroffen werden (Coyne et al., 2003; Hou et al., 2006; Hashimoto et al., 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das humane Claudin-3 in der etablierten Epithel-Zelllinie MDCK II überexprimiert, die sich durch einen geringen transepithelialen Widerstand sowie eine schwache endogene Claudin-3-Expression auszeichnet. Die transfizierten Zellen wurden hinsichtlich der Expression und Lokalisierung des exogenen Proteins sowie der Tight Junction-Morphologie und der parazellulären Durchlässigkeit für verschiedene Ionen, Makromoleküle und Wasser untersucht. Da MDCK II-Zellen durch eine sehr starke Expression von Claudin-2 charakterisiert sind, sollte in einem zweiten Modellsystem mit schwacher endogener Claudin-2-Expression analysiert werden, inwieweit die beobachteten Effekte der Claudin-3-Überexpression durch Claudin-2 beeinflusst werden. Dafür wurden Claudin-3-transfizierte Klone und Kontrollen mit schwacher endogener Claudin-2-Expression ausgewählt und parallel untersucht.

Das Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit war die Analyse der Expression und Regulation von Tight Junction-Komponenten in einem endothelialen Zellkulturmodell unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Unter natürlichen Konditionen ist das Endothel einer stetigen mechanischen Beanspruchung durch den Blutfluss ausgesetzt. Andererseits kann in pathologischen Situationen wie dem Gefäßverschluss der Blutfluss verlangsamt sein oder zum Erliegen kommen. Oft tritt parallel eine Unterversorgung mit Sauerstoff auf.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde anhand eines Zellkulturmodells der humanen Nabelschnurvene (HUVEC) untersucht, inwieweit sich fehlende Wandschubspannung allein oder in Kombination mit Hypoxie auf die Expression von Tight Junction-Proteinen auswirkt. Dazu wurde die Protein-Expression der in HUVEC vorhandenen Tight Junction-Komponenten Occludin, Claudin-3, -5, -11 und -23 analysiert. Darüber hinaus wurde die Regulation der durch fehlende Wandschubspannung verursachten Effekte auf transkriptioneller Ebene sowie die Beteiligung von zellulären Signaltransduktionswegen untersucht.

3. Material und Methoden

3.1 Material und Geräte

3.1.1. Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von Metabion (Planegg) synthetisiert.

Oligonukleotid Basensequenz (5'-3')

Cld-3 For	GCGGCAGCC ATG TCCATGGGC
Cld-3 Rev	GTCTGTCCCT TTAG ACGTAGTC
Hind Cld-3 For	AAAAAGCTT ATG TCCATGGGCCTGGAGATCA
Hind Cld-3 Rev	AAAAAGCTT TTAG ACGTAGTCCTTGCGGTGCG
Sh Cld-3-11 up	GGATCCGCATCATCACGGCGCAGATTTCAAGAGAATCTGCGCCGTGATGATGCTTTTTTA
Sh Cld-3-11 lo	AGCTTAAAAAGCATCATCACGGCGCAGATTCTCTTGAAATCTGCGCCGTGATGATGCG
Sh Cld-3-12 up	GGATCCGGCCAAGATCACCATCGTGTTCAGAGACACGATGGTGATCTTGGCCTTTTTTA
Sh Cld-3-12 lo	AGCTTAAAAAGGCCAAGATCACCATCGTGTCTCTTGAACACGATGGTGATCTTGGCCG
M13 For	GTAAAACGACGGCCAGT
M13 Rev	AACAGCTATGACCATG
N-CMV-30F	AATGTCGTAATAACCCCGCCCCGTTGACGC
C-CMV-24R	TATTAGGACAAGGCTGGTGGGCAC
T7 Prom short	TAATACGACTCACTATAGGG
BGH Rev	TAGAAGGCACAGTCGAGGCT
pRNA-H1 For	TAATACGACTCACTATAGGG
pRNA Rev	TAGAAGGCACAGTCGAGG
U6 MluI For	AAACGCGTGGGCAGGAAGAGGGC
U6 BamHI Rev	AAAGGATCCTCGTCCTTTCCACA

3.1.2. Plasmide

Vektor	Hersteller
pCR 2.1-TOPO (Klonierung)	Invitrogen, Karlsruhe
p3xFLAG-CMV-10 (cDNA-Expression)	Sigma, Taufkirchen

pcDNA3.1/Hygro (cDNA-Expression)	Invitrogen, Karlsruhe
pRNATin-H1.2/Hygro (shRNA-Expression, induzierbar)	GenScript Corporation, Piscataway, USA
RNAi-Ready pSIREN (shRNA-Expression)	Clontech, Heidelberg
psmRNATin-U6/Hygro (shRNA-Expression)	GenScript Corporation/ modifiziert

3.1.3. Enzyme

Enzym	Hersteller
HotStarTaq DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden
PfuTurbo Hotstart DNA-Polymerase	Stratagene, Heidelberg
BamH I-Restriktionsendonuklease	New England BioLabs, Frankfurt
Hind III-Restriktionsendonuklease	New England BioLabs, Frankfurt
Mlu I-Restriktionsendonuklease	New England BioLabs, Frankfurt
T4-DNA-Ligase	New England BioLabs, Frankfurt
T4 Polynukleotidkinase	New England BioLabs, Frankfurt
TaqMan Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt

3.1.4. Antikörper

Antikörper	Hersteller
Alexa Fluor Antikörper	MoBiTec, Göttingen
Anti-Claudin-Antikörper	Zymed, San Francisco, USA
Anti-FLAG M2 Antikörper	Sigma, Taufkirchen
Anti-Occludin-Antikörper	Zymed, San Francisco, USA

3.1.5. Kits

Kit	Hersteller
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
TOPO TA Cloning Kit (Ligation)	Invitrogen, Karlsruhe
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (DNA-Sequenzierung)	Applied Biosystems, Darmstadt
One Shot Top 10F' kompetente Zellen	Invitrogen, Karlsruhe

Plasmid Mini Kit/ Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Lipofectamine Reagent, Plus Reagent (Transfektion)	Invitrogen, Karlsruhe
BCA Protein Assay (Proteinquantifizierung)	Pierce, Rockford, USA
Western Blotting Kit	Roche Diagnostics, Mannheim

3.1.6. Zelllinien

CaCo-2

Die Zelllinie CaCo-2 stammt aus einem humanen colorektalen Adenokarzinom und dient wegen ihrer großen Ähnlichkeit mit gesundem Colonepithel als Modell für die intestinale Barriere.

MDCK (Madin-Darby Canine Kidney)

Die Zelllinie MDCK wurde 1953 von Madin und Darby aus der Niere des Hundes gewonnen und beschrieben. Es gibt mehrere Subzelllinien, die sich genetisch, morphologisch und funktionell voneinander unterscheiden (Richardson et al., 1981, Gekle et al., 1994). Während MDCK I und MDCK C7 dichte Epithelzellschichten mit transepithelialen Widerständen von 1000 bis zu mehreren tausend $\Omega\cdot\text{cm}^2$ ausbilden, ähneln MDCK II und MDCK C11 Zwischenzellen des Sammelrohrs und gehören zu den niederohmigen Zelllinien mit transepithelialen Widerständen zwischen 30 und 150 $\Omega\cdot\text{cm}^2$.

rbTAL (Rabbit Thick Ascending Limb)

rbTAL-Zellen stammen aus dem dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife (TAL) des Kaninchens und werden als Zellkulturmodell der Niere verwendet. Sie zeichnen sich durch schwache endogene Expression von Tight Junction-Proteinen aus.

HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)

HUVEC stammen aus der humanen Nabelschnurvene und dienen als endotheliales Modellsystem. Nach der Isolation werden sie in der Regel nur für wenige Passagen verwendet, da eine dauerhafte Kultur mit dem Verlust typischer Eigenschaften von nativen Endothelien verbunden ist. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden von Dr. A. Zakrzewicz (Institut für Physiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin) isoliert und kultiviert.

3.1.7. Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien	Hersteller
β -Mercaptoethanol	Clontech, Heidelberg
10 \times TAE-Puffer	Genaxxon Bioscience, Ulm
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	Serva, Heidelberg
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Taufkirchen
Ampicillin	Ratiopharm, Ulm
Bacto Agar	Difco, Heidelberg
Bromphenolblau (Laemmli)	Amersham, München
BSA	New England BioLabs, Frankfurt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Dextrane	Serva, Heidelberg
dNTPs	Roche Diagnostics, Mannheim
Dulbecco's PBS mit Mg/Ca	PAA Laboratories, Cölbe
Dulbecco's PBS ohne Mg/Ca	PAA Laboratories, Cölbe
EGTA	Serva, Heidelberg
Ethanol	T. J. Baker, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid	Invitrogen, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Invitrogen, Karlsruhe
FITC-Dextrane	Sigma, Taufkirchen
FKS	Biochrom, Berlin
Fluoreszein	Sigma, Taufkirchen
Geneticin (G418)	PAA Laboratories, Cölbe
Glutaraldehyd	Serva, Heidelberg
Glycerol	Invitrogen, Karlsruhe
IPTG	Sigma, Taufkirchen
Isopropanol	T. J. Baker, Deventer, Niederlande
LY 294002	Sigma, Taufkirchen
Magnesiumchlorid	Merck, Berlin
Methanol	Merck, Berlin
Natriumdesoxycholat	Merck, Berlin
Nonidet P40	Roche Diagnostics, Mannheim
Protein A Agarose	Upstate, Lake Placid, USA
Minimum Essential Medium mit Earl's Salts	Biochrom, Berlin

Minimum Essential Medium mit GlutaMAX	Invitrogen, Karlsruhe
Dulbecco's Minimum Essential Medium / Ham's F-12	PAA Laboratories, Cölbe
Hygromycin B	PAA Laboratories, Cölbe
Kollagenase CLS Typ III	Biochrom, Berlin
Endothelial Cell Basal Medium MV, Supplement Pack	PromoCell, Heidelberg
Molekulargewichtsmarker 100 bp	Invitrogen, Karlsruhe
Molekulargewichtsmarker LowMass	Invitrogen, Karlsruhe
Molekulargewichtsmarker λ /HindIII	Invitrogen, Karlsruhe
Page-Ruler Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
RNAzol	WAK Chemie, Bad Soden
SDS	Merck, Berlin
Silan	Amersham Biosciences, Freiburg
TEMED	Life Technologies, Karlsruhe
TRIS	Merck, Berlin
TRIS Base	Calbiochem, Bad Soden
TRIS-HCl	Biorad, München
Triton X-100	Roche, Mannheim
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin
TSR Sequenzierungsreagenz	Perkin Elmer, Wiesbaden
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Wasser	Fluka, Seelze
X-Gal	Life Technologies, Karlsruhe
TaqMan-Sonden	Applied Biosystems, Darmstadt

Nicht gesondert aufgeführte Chemikalien wie Natriumsalze für die Ringer-Lösungen wurden von den Firmen Sigma (Taufkirchen), Merck (Berlin) und Serva (Heidelberg) und Fluka (Seelze) bezogen.

3.1.8. Standardlösungen

1× TAE:	40 mM TRIS-Acetat pH 8,3 1 mM EDTA 0,005% Ethidiumbromid
10× West-Puffer:	1,9 M Glycin 0,25 M TRIS

5×Laemmli-Probenpuffer:	125 mM TRIS pH 6,8 500 mM DTT 50% Glycerol 10% SDS 0,001% Bromphenolblau
6×DNA Probenpuffer:	40% Sukrose 0,25% Bromphenolblau 5 mM EDTA pH 8
BSA-Blockierungslösung:	5% BSA 0,02% Natriumazid ad PBST
Gesamt-Lysepuffer:	10 mM Tris-Cl pH 7,5 150 mM NaCl 0,5% Triton X-100 0,1% SDS pro 10 ml Zugabe einer Tablette Complete Proteaseinhibitor (Roche)
Glutaraldehydpuffer für Gefrierbruch:	60 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mM KH_2PO_4 2,5% Glutaraldehyd
LB-Medium (fest):	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Bacto-Yeast extract 5 g/l NaCl Agar 100 µg/ml Ampicillin
LB-Medium (flüssig):	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Bacto-Yeast extract 5 g/l NaCl 100 µg/ml Ampicillin

Membran-Lysepuffer:	20 mM TRIS-Cl; pH 7,4 5 mM MgCl ₂ 1 mM EDTA 0,6 mM EGTA pro 10 ml Zugabe einer Tablette Complete Proteaseinhibitor (Roche)
PBST:	PBS-Tabletten (Gibco) 0,1% Tween 20
RIPA (<i>Radio Immuno Precipitation Assay</i>) – Lysepuffer:	150 mM NaCl 25 mM TRIS 5 mM EDTA 0,1% SDS 1% Nonidet P40 1% Natriumdesoxycholat pro 10 ml Zugabe einer Tablette Complete Proteaseinhibitor (Roche)
Sammelgel :	5,1% Acrylamid 0,125 M TRIS pH 6,8 0,1% SDS 0,1% APS 0,1% TEMED
SDS-Elektrophoresepuffer:	10 % 10×West-Puffer 0,1% SDS
Transferpuffer:	10% 10×West-Puffer 10% Methanol
Trenngel	12,5 % Acrylamid 0,35 M TRIS, pH 8,8 0,1% SDS 0,1% APS 0,1% TEMED

3.1.9. Ringer-Lösungen

HEPES-Ringer (Wasserflux)	134,6 mM NaCl 2,4 mM Na ₂ HPO ₄ 0,6 mM NaH ₂ PO ₄ 5,4 mM KCl 1,2 mM MgCl ₂ 1,2 mM CaCl ₂ 10,6 mM HEPES 10 mM Glukose pH 7,4
Mannitol-Ringer (Anionen)	280 mM Mannitol 5,4 mM KCl 1 mM MgSO ₄ 1,2 mM CaCl ₂ 10 mM HEPES 10 mM Glukose pH 7,4
Mannitol-Ringer (monovalente Kationen)	21 mM NaHCO ₃ 238 mM Mannitol 5,4 mM KCl 1 mM MgSO ₄ 1,2 mM CaCl ₂ 3 mM HEPES 10 mM Glukose pH 7,8
Mannitol-Ringer (divalente Kationen)	20 mM NaCl 240 mM Mannitol 5,4 mM KCl 1 mM MgSO ₄ 1,2 mM CaCl ₂ 10 mM HEPES 10 mM Glukose pH 7,4

modifizierte Ringer (Anionen)	140 mM NaBr/ NaI/ NaF 5,4 mM KCl 1 mM MgSO ₄ 1,2 mM CaCl ₂ 10mM HEPES 10 mM Glukose pH 7,4
modifizierte Ringer (monovalente Kationen)	21 mM NaHCO ₃ 119 mM LiCl/ KCl/ RbCl/ CsCl 5,4 mM KCl 1 mM MgSO ₄ 1,2 mM CaCl ₂ 3 mM HEPES 10 mM Glukose pH 7,8
modifizierte Ringer (divalente Kationen)	93,33 mM MgCl ₂ / CaCl ₂ / SrCl ₂ / BaCl ₂ 5,4 mM KCl 1 mM MgSO ₄ 1,2 mM CaCl ₂ 10 mM HEPES 10 mM Glukose pH 7,4
Natrium-Ringer (divalente Kationen, Anionen)	140 mM NaCl 5,4 mM KCl 1 mM MgSO ₄ 1,2 mM CaCl ₂ 10 mM HEPES 10 mM Glukose pH 7,4
Natrium-Ringer (monovalente Kationen)	21 mM NaHCO ₃ 119 mM NaCl 5,4 mM KCl

	1 mM MgSO ₄
	1,2 mM CaCl ₂
	3 mM HEPES
	10 mM Glukose
	pH 7,8
Standard-Ringer 111 (Größenmarker)	113,6 mM NaCl
	21 mM NaHCO ₃
	5,4 mM KCl
	2,4 mM Na ₂ HPO ₄
	1,2 mM MgCl ₂
	1,2 mM CaCl ₂
	0,7 mM NaH ₂ PO ₄
	10 mM Glukose

3.1.10. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien wie Zellkulturmaterial, Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen, Mikrotiterplatten, PVDF-Membranen und ähnliches wurden von den Firmen Eppendorf (Köln), Sarstedt (Nümbrecht), Nunc (Karlsruhe), Perkin Elmer (Wiesbaden), Applied Biosystems (Darmstadt) und Greiner (Frickenhäusen) bezogen. Permeable Zellkultureinsätze (Millicell HA, 0,6 cm²) für elektrophysiologische Messungen an Zellkulturen lieferte die Firma Millipore (Schwalbach). Kupfernetzgrids für die Gefrierbruchtechnik wurden von Ted Pella Inc (Redding, USA), Dialyseschläuche für die Fluxmessungen parazellulärer Größenmarker von Spectrum Laboratories (Breda, Niederlande) bezogen.

3.1.11. Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Fast Real-Time PCR System 7500	Applied Biosystems, Darmstadt
Electrochemical interface 1286	Solartron-Schlumberger, Farnborough, Großbritannien
Elektronenmikroskop Zeiss 902 mit Videokamera	Carl Zeiss AG, Oberkochen; Olympus iTEM Veleta, Münster
Flachbett- und Vertikal-Elektrophoresekammern	Bio-Rad, München
Frequency Response Analyzer 402	Beran Instruments, Gilching

Gefrierbruchgerät Denton DV-502	Denton Vacuum, Moorestown, USA
Heizblock	Grant, Berlin
Impedanzmessgerät	Institut für Klinische Physiologie, Charité, Berlin
Inkubatoren	Heraeus, Hanau; Binder
Kamera QuickStore	MS Laborgeräte
Konus-Platten-Apparatur	Institut für Physiologie, Charité, Berlin
Laminar-Flow-Werkbank HERA-safe	Thermo Electron Corporation
LAS CCD-Kamera	Fujifilm, Tokio, Japan
Konfokales Laserscanning-Mikroskop 510 Meta	Carl Zeiss AG, Berlin
Lichtmikroskop	Olympus
Magnetrührer IKAMAK Reo	Ika-Combimag, München
MVE CryoSystem 3000	German-Cryo
pH-Meter HI 9017 microprocessor	Hanna Instruments, Kehl
Plattenlesegeräte	
Tecan Spectra-Photometer	Tecan, Grödig, Österreich
Spectramax Gemini	Molecular devices, Ismaning
Sequenziergerät AbiPrism 310	Perkin Elmer, Wiesbaden
Spannungsgeräte	Bio-Rad, München; Biometra, Göttingen
Spektrophotometer NanoDrop ND-1000	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Test-Tube-Rotator	Snijders, Wien, Österreich
Thermocycler GeneAmp PCR System 2400	PerkinElmer, Wiesbaden
Ussing-Kammern	Institut für Klinische Physiologie, Charité, Berlin
Vortex-Geräte	Pharmacia, Freiburg
Waagen	Sartorius, Göttingen
Wassertransportstand	Institut für Klinische Physiologie, Charité, Berlin
Widerstandsmessgerät	Institut für Klinische Physiologie, Charité, Berlin
Wiegeschüttler	Biometra, Göttingen
Zentrifugen	
Qualitron Mini Centrifuge	MS Laborgeräte, Wiesloch
Microcentrifuge Z233 MK	Hermle Labortechnik, Wehingen
Avanti-J25 Centrifuge	Beckman Instruments, München
Univapo 100 H Vacuum Concentrator	MS Laborgeräte, Wiesloch
Laboratory Medical Centrifuge LMC-3000	BioSan, Riga, Lettland

3.1.12. Software

Neben Microsoft Office für Standardanwendungen und zu Geräten gehöriger Software wurden Chromas für die Auswertung von DNA-Sequenzierungen und AIDA Raytest (Straubenhardt) für die densitometrische Analyse von Western-Blots verwendet.

3.2 Methoden

3.2.1. Klonierung des humanen Claudin-3-Gens

3.2.1.1. RNA-Extraktion

Für die Gewinnung der Gesamt-RNA aus der humanen Karzinom-Zelllinie Caco-2 wurde das RNazol-B-Reagenz von WAK Chemie verwendet. Dazu wurden konfluent gewachsene Zellen zunächst mit PBS gewaschen, anschließend mit RNazol versetzt, von der Zellkulturflasche abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde mit einem Zehntel Volumen Chloroform versetzt. Nach gründlicher Vermischung (30 s Vortex) erfolgten eine 5-minütige Inkubation auf Eis und anschließende Zentrifugation bei 12.000 \times g und 4 °C für 15 min. Der wässrige, RNA-haltige Überstand wurde mit demselben Volumen an Isopropanol gemischt und die RNA durch 30-minütige Inkubation bei -20 °C ausgefällt. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 12.000 \times g und 4 °C wurde das Pellet mit eiskaltem 70% Ethanol gewaschen (10 min Zentrifugation bei 12.000 \times g, 4 °C), getrocknet und in DEPC-haltigem Wasser resuspendiert. Konzentration und Reinheit der präparierten RNA wurden mittels NanoDrop-Spektrophotometer (Pepqlab) ermittelt.

3.2.1.2. Reverse Transkription

Die präparierte Gesamt-RNA wurde mit Hilfe der Reversen Transkriptase und unspezifischen Oligo-d(T)-Primern (High Capacity cDNA Reverse Transcription, Applied Biosystems) in copy-DNA (cDNA) umgeschrieben, welche anders als genomische DNA den Leserahmen des Proteins ohne Introns enthält. Folgender Reaktionsansatz wurde hergestellt:

2 μ l	10 \times RT-Puffer
2 μ l	dNTP-Mix (je 5 mM)
2 μ l	Oligo-d(T)-Primer
1 μ l	Rnase-Inhibitor (10 U/ μ l)
1 μ l	Reverse Transkriptase
2 μ g	Gesamt-RNA
ad 20 μ l	H ₂ O (Rnase-frei)

Der Ansatz wurde 10 min bei 25 °C und anschließend 2 h bei 37 °C inkubiert. Die so erhaltene cDNA wurde als Template für die PCR verwendet.

3.2.1.3. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die spezifische Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Abschnitts mittels einer DNA-Polymerase.

Für die Gewinnung des humanen Claudin-3-Gens aus cDNA kam neben einem Claudin-3-spezifischen Primerpaar, welches das Start- beziehungsweise Stopp-Codon des Gens überspannte (Verweis auf Tabelle mit Primern), die Pfu-DNA-Polymerase (Stratagene) zum Einsatz. Diese Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* besitzt eine *proofreading*-Aktivität und ermöglicht die nahezu fehlerfreie Amplifikation. Folgender Reaktionsansatz wurde hergestellt:

5	µl	10× Pfu-Puffer
2	µl	MgCl ₂ (25 mM)
5	µl	dNTP-Mix (je 2,5 µM)
2,5	µl	<i>forward</i> -Primer (10 µM)
2,5	µl	<i>reverse</i> -Primer (10 µM)
1	µl	cDNA
1	µl	Pfu-Polymerase
ad 50	µl	H ₂ O

Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler nach folgendem Programm:

	2 min	95 °C
35 Zyklen:	30 s	95 °C
	30 s	58 °C
	60 s	72 °C
	10 min	72 °C
	∞	4 °C

Länge und Qualität des Amplifikats wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

3.2.1.4. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von DNA-Fragmenten gemäß ihrer Größe und das anschließende Sichtbarmachen mit Hilfe der interkalierenden Substanz Ethidiumbromid und UV-Licht.

Zur Kontrolle des aus der PCR erhaltenen Amplifikats wurde zunächst ein 1 % Agarosegel hergestellt. Dazu wurde Agarose in TAE-Puffer mit 0,5% Ethidiumbromid aufgekocht, auf 50-60 °C abgekühlt und in einen vorbereiteten Gelschlitten mit Taschenschablone gegossen. Nach Aushärten wurde das Gel in eine Flachbett-Elektrophoresekammer überführt und mit TAE-Puffer mit 0,5% Ethidiumbromid bedeckt. Anschließend wurden 5 µl des PCR-Ansatzes mit 1 µl 6× Probenpuffer versetzt und in eine Tasche des Gels geladen. Parallel wurde eine weitere Tasche des Gels mit einem Längenstandard beschickt. Nach erfolgter Gelelektrophorese bei 60 V für etwa 1 h wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert, um den Erfolg der voran gegangenen PCR zu überprüfen.

3.2.1.5. Ligation in den Klonierungsvektor

Nach erfolgreicher Gewinnung des humanen Claudin-3-Gens erfolgte die Ligation in den Klonierungsvektor pCR 2.1-TOPO (Invitrogen) mittels TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen). Dieser Vektor ermöglicht die spätere Selektion positiver Klone mit Hilfe eines Gens für Ampicillinresistenz sowie die Blau-Weiß-Selektion. Für die Transformation wurden 4 µl des Claudin-3-Amplifikats mit 1 µl Salt-Solution und 1 µl linearisiertem Vektor gemischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation kompetenter Zellen mit dem erhaltenen Konstrukt.

3.2.1.6. Transformation kompetenter Bakterienzellen

Die Transformation von Bakterien bezeichnet das Einbringen eines Fremdplasmids in kompetente Zellen zum Zweck der Archivierung und Vermehrung des entsprechenden Plasmids.

Kompetente *Escherichia coli*-Zellen (One Shot Top 10F', Invitrogen) wurden auf Eis aufgetaut und mit dem Ligationsprodukt versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen zunächst einem Hitzeschock ausgesetzt (30 s, 42 °C), auf Eis abgekühlt und mit SOC-Medium versetzt. Der Ansatz wurde 1,5 h bei 37 °C sanft geschüttelt,

anschließend auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin als Selektionsmarker sowie 40 µl X-Gal und 4 µl IPTG ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Erfolgreich transformierte Kolonien konnten so aufgrund der erworbenen Ampicillin-Resistenz identifiziert werden. Die zusätzliche Blau-Weiß-Selektion ermöglichte die Unterscheidung zwischen Kolonien mit leerem Vektor (blau) und Klonen mit Claudin-3-enthaltendem Vektor (weiß). Im unveränderten Vektor wird das Gen für die β -Galaktosidase exprimiert. Das entsprechende Enzym verstoffwechselt das Substrat X-Gal, wodurch ein blauer Farbstoff entsteht. Bei erfolgter Insertion wird das Gen für die β -Galaktosidase zerstört und die Blaufärbung unterbleibt. Eine Auswahl an selektierten Klonen wurde zum Animpfen von Flüssigkulturen verwendet, aus denen anschließend die Plasmid-DNA isoliert wurde.

3.2.1.7. Plasmid-Präparation

Die Plasmid-Präparation erfolgte mit Hilfe des Plasmid Mini Kits von Quiagen. Dafür wurden zunächst 4 ml Ampicillin-haltigen LB-Flüssigmediums mit jeweils einer Kolonie der Selektionsplatte angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter sanftem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 1,5 ml der Kultur in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 250 $\times g$ zentrifugiert. Das gewonnene Zellpellet wurde in 300 µl P1-Puffer resuspendiert und anschließend mit 300 µl P2-Puffer gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz mit 300 µl P3-Puffer versetzt, erneut vorsichtig gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 18.000 $\times g$ für 15 min bei 4 °C. 800 µl des Plasmid-enthaltenden Überstandes wurden mit 400 µl Isopropanol gemischt und ca. 1 h bei -20 °C inkubiert. Die so gefällte Plasmid-DNA wurde durch Zentrifugation bei 18.000 $\times g$ und 4 °C gewonnen und mit 70 % Ethanol gewaschen (10 min Zentrifugation 18.000 $\times g$, 4 °C). Das gewonnene Pellet wurde unter Anlegen eines Vakuums getrocknet und in 50 µl Wasser resuspendiert. Qualität und Quantität der Präparation wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Für die Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-DNA wurde das Plasmid Midi Kit von Quiagen benutzt, das ähnlich wie das Plasmid Mini Kit verwendet wird, aber Plasmid-Präparationen aus zehnfach größeren Kulturen ermöglicht.

3.2.1.8. DNA-Sequenzierung

Um die Korrektheit des klonierten Claudin-3-Gens zu überprüfen, wurde eine Auswahl an präparierten Klonen einer DNA-Sequenzierung nach Sanger unterzogen. Bei diesem Verfahren erfolgt ausgehend von einem Primer die Synthese des zur Matrize

komplementären Stranges, wobei der Reaktionsansatz neben dNTPs zur Kettenverlängerung auch fluorophormarkierte Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs) enthält. Beim Einbau eines ddNTPs anstelle eines dNTPs erfolgt ein Kettenabbruch, wodurch Fragmente verschiedener Größe entstehen, die ihrer Größe nach aufgetrennt und sichtbar gemacht werden können. Ausgehend vom Muster der Fragmente für die verschiedenen Basen kann die Nukleotidsequenz bestimmt werden.

Folgender Reaktionsansatz wurde mit Hilfe des BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems) hergestellt:

2 µl	5× Puffer
2 µl	Premix-Lösung
5 µl	Plasmid-DNA
1 µl	Primer (10 µM)

Die Kettenabbruch-Reaktion erfolgte im Thermocycler nach folgendem Programm:

	5 min	96 °C
25 Zyklen:	10 s	96 °C
	5 s	55 °C
	4 min	60 °C
	∞	4 °C

Nach der Reaktion wurden die Ansätze mit Hilfe von Gelfiltrationssäulen (EdgeBio) aufgereinigt. Die bei 4 °C gelagerten Säulen wurden zunächst leer zentrifugiert (2 min, 750 ×g, 4 °C). Danach wurde die Säule in ein neues Gefäß überführt, der Reaktionsansatz aufgetragen und die Zentrifugation wiederholt. Das Eluat wurde ggf. mittels Vakuumzentrifugation auf ein Volumen von ca. 5 µl konzentriert und anschließend mit 20 µl TSR (*template suppression reagent*, Applied Biosystems) versetzt. Es folgten Denaturation für drei Minuten bei 96 °C, schnelles Abkühlen auf Eis und kurze Zentrifugation zur Entfernung von Luftblasen. Anschließend erfolgte die Sequenzierung im Abi Prism 310 (Perkin Elmer).

Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mittels einer Software zur Darstellung der Peakfolge (Chromas). Die Richtigkeit der klonierten Claudin-3-Sequenz wurde mit Hilfe der molekularbiologischen Datenbank BLAST überprüft.

3.2.1.9. Anfügen von Restriktionssequenzen

Um das Claudin-3-Gen in einen Expressionsvektor einbringen zu können, wurden Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease Hind III bzw. BamH I an die äußeren Enden der Nukleotidsequenz angefügt. Dies erfolgte in einer PCR wie unter 3.2.1.3. beschrieben unter Verwendung von Claudin-3-spezifischen Primern, die um die entsprechenden Schnittstellen verlängert waren.

3.2.1.10. Restriktion mit Hind III oder BamH I

Für eine erfolgreiche Ligation in die Expressionsvektoren p3×FLAG-CMV-10 (Sigma) bzw. pcDNA3.1/Hygro (Invitrogen) wurden sowohl die Vektoren als auch das Claudin-3-Insert mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen Hind III bzw. BamH I geschnitten. Restriktionsansätze für Plasmid und Insert wurden wie folgt hergestellt:

5 µl	DNA (Plasmid bzw. Insert)
2 µl	10× Puffer II
2 µl	Restriktionsendonuklease
ad 20 µl	H ₂ O

Den Ansätzen mit BamH I wurde jeweils BSA in einer Endkonzentration von 1% hinzugefügt. Die Ansätze wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert. Bei den mit Hind III inkubierten Ansätzen erfolgte anschließend die Inaktivierung des Enzyms für 20 min bei 65 °C, um unspezifische Restriktion zu vermeiden. BamH I ist hingegen nicht durch Hitze inaktivierbar, weshalb dieser Schritt in den entsprechenden Ansätzen unterblieb. Im Anschluss wurde das geöffnete Plasmid mit Hilfe der Antarktischen Phosphatase dephosphoryliert, um die Religation zu verhindern.

Dazu wurden dem Restriktionsansatz je 2,5 µl der Antarktischen Phosphatase sowie des entsprechenden Puffers (New England Biolabs) zugefügt. Es erfolgten eine 15-minütige Inkubation bei 37 °C sowie die anschließende Inaktivierung des Enzyms bei 65 °C für 20 min. Der Erfolg der Restriktion wurde mittels DNA-Gelelektrophorese überprüft. Durch Abgleich mit einem Konzentrationsmarker konnte die DNA-Konzentration der Ansätze abgeschätzt werden.

3.2.1.11. Ligation in Expressionsvektoren

Für die Expression in eukaryotischen Zellen wurde die Claudin-3-Nukleotidsequenz in die Expressionsvektoren p3×FLAG-CMV-10 bzw. pcDNA3.1/Hygro inseriert. Der Vektor p3×FLAG-CMV-10 enthält zwischen dem CMV-Promotor und der *multiple cloning site* (MCS) eine 3×FLAG-Tag-Sequenz (Abb. 7), so dass bei der späteren Expression ein Fusionsprotein aus dem N-terminalen 3× FLAG-Peptid (33 AS) und dem Protein entsteht.

Für die Ligation von Vektor und Insert mittels der T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) wurde folgender Reaktionsansatz hergestellt:

1 µl	10× T4-DNA-Ligase-Puffer
1 µl	T4-DNA-Ligase
100 ng	Insert
50 ng	Vektor
ad 10 µl	H ₂ O

Die Ligation erfolgte bei 14 °C über Nacht.

Anschließend wurde die Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen wie unter 3.2.1.6. beschrieben mit den Expressionsvektor-Claudin-3-Konstrukten wiederholt. Anders als bei der Transformation mit dem Klonierungsvektor fand jedoch keine Blau-Weiß-Selektion statt.

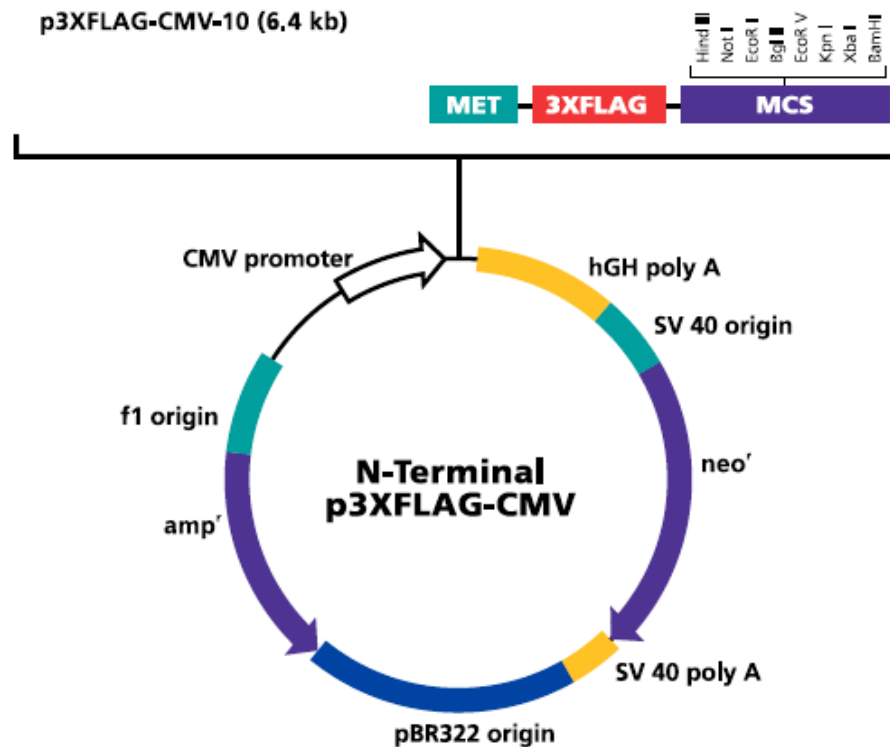


Abb. 7: Schematische Darstellung des Expressionsvektors p3XFLAG-CMV (Sigma).

3.2.1.12. Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR ermöglicht die schnelle und einfache Identifizierung von Insert-tragenden Klonen nach erfolgter Transformation.

Dazu wurden mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze einzelne Bakterienkolonien von der Agar-Platte entnommen und auf eine frische Platte (Masterplatte) übertragen. Parallel wurde ein Teil der Kolonie in ein mit 5 µl Triton-X-100 beschicktes PCR-Reaktionsgefäß überführt. Die so lysierten Bakterien wurden mit einem PCR-Mastermix gemischt, der einen Insert-spezifischen sowie einen Vektor-spezifischen Primer enthielt. Wegen der ausschließlich analytischen Funktion dieser PCR wurde die HotStarTaq DNA-Polymerase (Quiagen) aus *Thermus aquaticus* ohne *proofreading*-Aktivität verwendet. Folgender Mastermix (25 Proben) wurde hergestellt:

125 µl	10× PCR-Puffer II
75 µl	MgCl ₂
70 µl	dNTP-Mix (je 2,5 mM)

5 µl	HotStarTaq DNA-Polymerase
25 µl	Insert-spezifischer Primer (10 µM)
25 µl	Vektor-spezifischer Primer (10 µM)
800 µl	H ₂ O

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

	2 min	95 °C
25 Zyklen:	30 s	95 °C
	30 s	55 °C
	90 s	72 °C
	10 min	72 °C
	∞	4 °C

Nach erfolgter PCR wurden die Ansätze mittels Agarose-Gelelektrophorese auf das Vorhandensein eines PCR-Produktes überprüft und so Claudin-3-positive Klone selektiert.

Ausgehend von den Kolonien der Masterplatte wurden Plasmid-Präparation und DNA-Sequenzierung wiederholt.

3.2.1.13. Anlegen von Glycerolstocks

Für eine dauerhafte Aufbewahrung der transformierten *E. coli*-Klone wurden Stammkulturen angelegt. Dazu wurden 850 µl der LB-Flüssigkultur und 150 µl Glycerol in einem Cryo-Röhrchen gemischt und bei –80 °C gelagert.

3.2.2. Klonierung von shRNA zur Hemmung des Claudin-3-Gens

Die RNA-Interferenz stellt in Eukaryoten einen natürlichen Mechanismus dar, unerwünschte RNA-Spezies aus Viren oder transposablen Elementen spezifisch zu erkennen und zu zerstören.

In der Molekularbiologie ermöglicht der Einsatz von RNA-Interferenz die spezifische Hemmung der Translation bestimmter mRNAs, also den *Knock-down* von Genen. Dafür können sogenannte *small inhibitory* RNAs (siRNAs), die spezifisch an die mRNA des Zielgens binden können, direkt in die Zelle eingebracht werden. Für den stabilen *Knock-down* eignen sich *small hairpin* RNAs (shRNAs), die nach der Transfektion der Zelle mit einem Expressionsvektor ausgehend von Matrizen-DNA synthetisiert und anschließend durch zelluläre Systeme (RISC und Dicer) prozessiert werden.

Zur Inhibition des Claudin-3-Gens in MDCK C7-Zellen wurden zwei von Hou et al. (2006) verwendete shRNA-Sequenzen benutzt. Dazu wurde die Zielsequenz als DNA-Oligonukleotid in 5'-3'-Richtung sowie revers komplementär synthetisiert (Metabion), wobei die äußeren Enden Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen BamH I bzw. HindIII zur Klonierung in den Expressionsvektor trugen. Für die Hybridisierung der beiden Stränge wurde folgender Reaktionsansatz hergestellt:

je 2 µl	Oligonukleotide (100µM)
1 µl	20× SSC
ad 20 µl	Aqua

Der Ansatz wurde wie folgt inkubiert:

4 min	96 °C
10 min	72 °C
5 min	20 °C
∞	4 °C

Anschließend erfolgte die 5'-Phosphorylierung des erhaltenen Doppelstranges mit Hilfe der T4 Polynukleotidkinase nach folgendem Ansatz:

1 µl	10× T4 Polynukleotidkinase-Puffer
1 µl	10 mM ATP
2 µl	Oligonukleotide
0,5 µl	T4 Polynukleotidkinase
ad 10 µl	Aqua

Der Ansatz wurde wie folgt inkubiert:

30 min	37 °C
10 min	70 °C
∞	4 °C

Restriktion und Ligation in die Expressionsvektoren erfolgten wie bereits unter 3.2.1. beschrieben.

Als Expressionsplasmid wurde zunächst der Vektor pRNATin-H1.2/Hygro (GenScript) verwendet, welcher das Gen für das grün-fluoreszierende Protein (GFP) als Selektionsmarker enthält und die shRNA-Matrize unter die Kontrolle des H1.2-Promotors bringt. Um den GFP-Marker und den stärkeren Promotor U6 auf einem Vektor zu kombinieren, wurde der H1.2-Promotor in pRNATin-H1.2/Hygro durch den pRNATin-U6-Promotor aus RNAi-Ready pSIREN ersetzt (psmRNATin-U6/Hygro, Abb. 8). Dazu wurde der U6-Promotor mittels PCR amplifiziert und über die Schnittstellen Mlu I und BamH I in pRNATin-H1.2/Hygro inseriert, nachdem der H1.2-Promotor zuvor durch Restriktion mit Mlu I und BamH I entfernt worden war.

Anschließende Transformationen und Plasmid-Präparationen erfolgten wie unter 3.2.1. beschrieben.

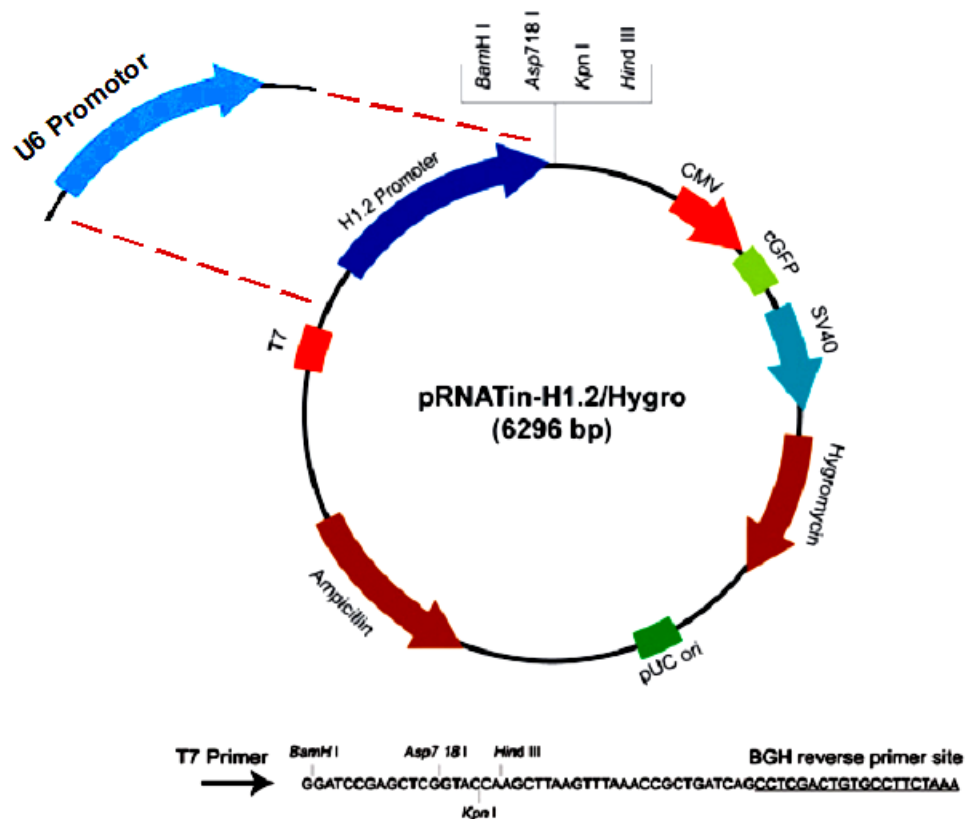


Abb. 8: Schematische Darstellung des sh-RNA-Expressionsvektors pRNATin-H1.2/Hygro von Genscript. Um das Marker-Gen GFP mit dem stärkeren Promotor U6 auf demselben Plasmid zu kombinieren, wurde ein weiterer Vektor generiert, bei dem der induzierbare H1.2-Promotor durch den U6-Promotor ersetzt wurde (psmRNATin-U6/Hygro).

3.2.3. Transgene Expression in eukaryotischen Zelllinien

3.2.3.1. Zellkultur

Sämtliche verwendete Epithel-Zelllinien (CaCo-2, MDCK, rbTAL) wurden in einem Inkubator bei konstanter Temperatur von 37 °C und 5% CO₂-Atmosphäre kultiviert. Als Erhaltungskultur wurden die Zellen in Zellkulturflaschen mit MEM-Medium mit 10% FKS (CaCo-2-Zellen: 15%) und 1% Penicillin/Streptomycin gehalten. Alle zwei bis drei Tage wurde das Zellkulturmedium gewechselt. Ein- bis zweimal wöchentlich wurden die Zellen mikroskopisch überprüft und bei 100%iger Konfluenz umgesetzt. Dazu erfolgten das Waschen mit kalzium- und magnesiumfreiem PBS und eine anschließende Inkubation in Trypsin bei 37 °C. Nach Ablösen vom Flaschenboden wurden die Zellen in vorgewärmtem

Medium resuspendiert, durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt und auf mehrere neue Flaschen passagiert.

Nach ca. 20 Passagen wurden die Zellen verworfen und frische Kulturen aus einer Stammkultur angelegt.

3.2.3.2. Stabile Transfektion

Für die stabile Transfektion wurden die Zellen auf 55×15 mm Zellkulturschalen in einer Dichte von 5×10^5 Zellen pro Schale ausgesät. Dafür wurden die Zellen wie unter 3.2.3.1. beschrieben trypsinisiert und resuspendiert. Anschließend wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und eines Lichtmikroskops die Zellzahl ermittelt.

Etwa 24 h nach Aussaat wurden die Zellen bei 50-80%iger Konfluenz mittels Lipofektion transfiziert. Bei der verwendeten Transfektionsmethode interagieren das Reagenz Lipofectamine (Invitrogen) und die zu transfizierende DNA, wobei es zur Bildung von hoch diffusionsfähigen Partikeln kommt. Nach Anheftung an die Zelloberfläche und Interaktion mit anionischen Glykoproteinen der Zellmembran wird der Komplex aus Lipofectamine und DNA durch Endozytose in die Zelle aufgenommen.

Für die Transfektion wurde folgender Ansatz pro Schale hergestellt: 100 µl serumfreien Mediums wurden mit 1 µg DNA und 10 µl Plus-Reagenz (Invitrogen) versetzt. In einem weiteren Ansatz wurden 100 µl serumfreien Mediums mit 6 µl Lipofectamine gemischt. Beide Ansätze wurden 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend miteinander gemischt und weitere 15 min stehen gelassen. In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit kalzium- und magnesiumfreien PBS gewaschen und mit serumfreiem Medium versetzt. Schließlich wurde der Transfektionsansatz tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. Nach vierstündiger Inkubation im Brutschrank erfolgte ein Wechsel zu normalem, FKS-haltigen Zellkulturmedium.

3.2.3.3. Selektion

Drei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen wie oben beschrieben trypsinisiert und auf mehrere Zellkulturschalen geteilt. Nach weiteren 24 h wurde zu Antibiotika-haltigem Medium gewechselt, um erfolgreich transfizierte Klone zu selektieren und nicht transfizierte Zellen abzutöten. Das Selektionsmedium wurde alle zwei bis drei Tage erneuert, bis eine mitgeführte nicht transfizierte Kontrolle vollständig abgestorben war. Anschließend wurde die Dosis des Antibiotikums auf die spätere Haltungsdosis gesenkt. Die nach sieben bis 14

Tagen nach Transfektion zu Kolonien aus 20 bis 100 Zellen herangewachsenen Klone wurden in fixierten hohlen Glaszylindern trypsinisiert und in 24-Well-Platten überführt. Nach Erreichen von 90-100%iger Konfluenz wurden die Klone zunächst auf Six-Well-Platten und schließlich auf Zellkulturflaschen passagiert. Bei den späteren Passagen wurde ein Teil der Zellen für ein anschließendes Screening auf Deckgläschen und Six-Well-Platten ausgesät und für Immunfluoreszenzfärbungen bzw. Immunblotting verwendet.

Die mittels Immunfluoreszenzfärbung und Western-Blotting selektierten Klone wurden wie oben (3.2.3.1.) beschrieben unter Verwendung von Selektionsantibiotika kultiviert und passagiert. Für das Anlegen von Stammkulturen wurden die Zellen trypsinisiert und bei 1000 $\times g$ für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit DMSO-haltigem Zellkulturmedium (10% FKS; 1% Penicillin/Streptomycin; 7,5% DMSO) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Cryo-Röhrchen überführt und mit Hilfe von Isopropanol enthaltenden Freezing-Containern langsam auf eine Temperatur von $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Die dauernde Lagerung erfolgte in der Gasphase flüssigen Stickstoffs in entsprechenden Tanks.

3.2.4. Behandlung von HUVEC mit Wandschubspannung und Hypoxie

3.2.4.1. Isolation und Kultur von HUVEC

HUVEC wurden frisch aus der Nabelschnurvene isoliert. Dazu wurde die Nabelschnurvene zunächst mit Hank-Lösung gespült, um Blutreste zu entfernen. Anschließend erfolgten das Füllen mit 0,2% Kollagenase (Biochrom) und eine 15-minütige Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Anschließend wurden die Endothelzellen aus der Vene gewaschen, pelletiert und resuspendiert. Die Kultivierung erfolgte auf mit Fibronektin (10 $\mu\text{g/ml}$) beschichteten Zellkulturflaschen bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5% CO_2 -Atmosphäre in Endothelzell-Medium mit Supplementen (PromoCell) und 5% FKS. Konfluent gewachsene Zellen wurden auf Zellkulturschalen ausgesät und einen Tag nach Erreichen von Konfluenz für Experimente mit Wandschubspannung und Hypoxie verwendet.

3.2.4.2. Applikation von Wandschubspannung und Hypoxie

Für die Anwendung von Wandschubspannung wurde eine Konus-Platten-Apparatur (Abb. 9) verwendet, welche eine gleichmäßige Applikation von Wandschubspannung über den gesamten Bereich einer Petrischale (Durchmesser 10 cm) ermöglicht. Die Wandschubspannung τ_w (dyn/cm^2) berechnet sich nach der Gleichung:

$$\tau_w = (\omega / \alpha) \cdot \eta$$

ω Winkelgeschwindigkeit (rad/s)

α Konuswinkel (rad)

η Viskosität (dyn·s·cm⁻²)

Die Temperatur betrug konstant 37 °C, die mittlere Viskosität 0,0075 dyn·s·cm⁻², der Konuswinkel 1°, die konstante Winkelgeschwindigkeit 14 rad/s und die Rotationsgeschwindigkeit 134 rpm. Unter diesen Bedingungen konnten laminare Strömungsbedingungen gewährleistet werden. Die Konus-Platten-Apparatur wurde in einem Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂-Atmosphäre platziert und HUVEC wurden für 4, 6, 12 oder 24 Stunden entweder mit einer konstanten Wandschubspannung von 6 dyn/cm² oder ohne Wandschubspannung behandelt.

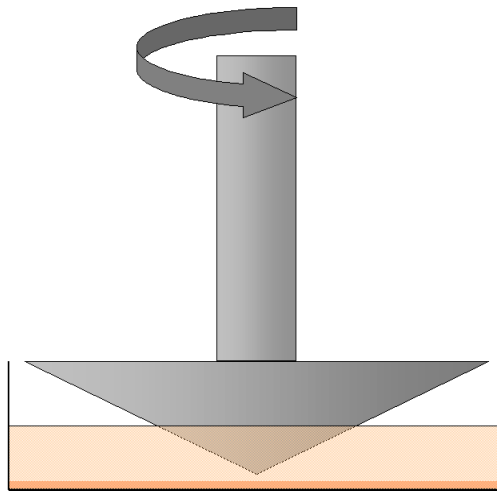


Abb. 9: Schema einer Konus-Platten-Apparatur zur gleichmäßigen Applikation von Wandschubspannung.

In einem weiteren Ansatz wurden das Fehlen der natürlichen Wandschubspannung mit der Applikation von Hypoxie kombiniert. Dazu wurden HUVEC bei 37 °C ohne Wandschubspannung in einer 3% O₂-Atmosphäre inkubiert.

Nach dem Experiment wurden die Zellen für RNA- oder Proteinpräparationen verwendet.

3.2.5. Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR ermöglicht die Quantifizierung der eingesetzten Matrizen-DNA ausgehend von der Menge des PCR-Produkts. Auf diese Weise kann indirekt die Transkriptionshäufigkeit eines Gens ermittelt werden, indem isolierte mRNA zunächst in cDNA umgeschrieben und schließlich einer Real-Time-PCR unterzogen wird.

Für die Quantifizierung der mRNA wurde das TaqMan PCR Assay (Applied Biosystems) verwendet. Dabei wird eine bestimmte Sequenz des Zielgens durch spezifische Primer vervielfältigt. Gleichzeitig wird eine Oligonukleotid-Sonde eingesetzt, deren 5'-Ende einen fluoreszenten Reporter-Farbstoff (i.d.R. FAM) trägt, während das 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff markiert und mit einem Phosphatrest blockiert ist. Wird die intakte Sonde bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt, wird das Fluoreszenz-Signal durch die räumliche Nähe zum Quencher durch einen Fluoreszenz-Energie-Transfer unterdrückt. In der Extensionsphase der PCR wird die Sonde durch die Taq-Polymerase verdrängt und mit Hilfe der 5'-3'-Exonukleaseaktivität hydrolysiert. Nicht hybridisierte Sonde wird hingegen nicht degradiert. Durch die Hydrolyse der Sonde wird die räumliche Nähe von Fluoreszenzfarbstoff und Quencher aufgehoben und es kommt zur Emission von Fluoreszenz, die der Akkumulation des PCR-Produktes entspricht.

Für die Durchführung der Real-Time-PCR wurde zunächst wie unter 3.2.1.1. beschrieben die Gesamt-RNA aus Zellen isoliert, quantifiziert und in cDNA umgeschrieben. Je 2 µl des Ansatzes wurden für die Real-Time-PCR eingesetzt. Mastermix-Ansätze für das zu analysierende Gen sowie die externe Kontrolle GAPDH wurden wie folgt hergestellt:

pro Ansatz: 10 µl	2×Mix (Applied Biosystems)
1 µl	TaqMan Sonde (Applied Biosystems)
7 µl	Wasser
2 µl	cDNA

Die Reaktionsplatte wurde mit Folie fest verschlossen und kurz zentrifugiert, um Luftblasen aus den Ansätzen zu entfernen. Anschließend erfolgte die Real-Time-PCR mit Hilfe des 7500 Fast Real-Time PCR Sytem (Applied Biosystems) und die anschließende Auswertung mittels systemeigener Software. Für jede Probe wurde GAPDH als externer Standard mitgeführt und die Ergebnisse wurden auf GAPDH normalisiert. Die Effekte einer bestimmten Behandlung wurden in Bezug zur unbehandelten Kontrolle gesetzt.

3.2.6. Western-Blotting

3.2.6.1. Gesamtproteinextraktion

Für die Gewinnung des Gesamtproteins aus eukaryotischen Zellen wurden diese zunächst zweimal mit PBS gewaschen, anschließend mit Gesamtlysepuffer abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach etwa 60-minütiger Inkubation auf Eis und gelegentlichem Mischen (Vortex) erfolgte die Abtrennung der Zellreste durch Zentrifugation (15 min, 15.000 $\times g$, 4 °C). Der Überstand, der das zelluläre Gesamtprotein enthielt, wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und weiter benutzt.

3.2.6.2. Membranproteinextraktion

Für die Isolierung des Membranproteins aus eukaryotischen Zellen wurden diese zunächst mit PBS gewaschen, mit Membran-Lysepuffer versetzt, abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit Hilfe von Insulinnadeln (Durchmesser 0,45 mm) homogenisiert und zur Entfernung der Zelltrümmer zentrifugiert (5 min, 200 $\times g$, 4 °C). Für die Gewinnung des membranständigen Proteins wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und 30 min bei 42.000 $\times g$ und 4 °C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet enthielt die Membranproteinfraktion und wurde in frischem Membran-Lysepuffer resuspendiert.

3.2.6.3. Proteinquantifizierung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte nach Pierce (BCA Protein Assay, Pierce). Dabei reagiert Protein unter alkalischen Bedingungen mit Kupfer, wodurch ein farbiger Komplex entsteht, der mittels Absorptionsmessung bei 562 nm quantifiziert werden kann und proportional zur Proteinkonzentration ist. Mit Hilfe einer Eichreihe bekannter Proteinkonzentrationen kann der Proteingehalt einer Probe bestimmt werden.

Die Vermessung der Proben erfolgte in 96-Well-Mikrotiterplatten. Als Eichreihe diente eine BSA-Lösung der Konzentrationen 0,2; 0,8 und 1,2 $\mu g/\mu l$. Es wurden jeweils 10 μl der Proben in Duplikaten in die Platte pipettiert und mit 190 μl der fertigen BCA-Gebrauchslösung (BCA Protein Assay, Pierce) versetzt. Anschließend erfolgten eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C und die Absorptionsmessung mittels Tecan Spectra-Photometer bei 562 nm.

3.2.6.4. SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht die Auftrennung eines Proteingemisches in Abhängigkeit von der Proteingröße. Die Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat (SDS) verursacht die Denaturierung der Proteine sowie die Einführung einer negativen Gesamtladung unabhängig von der Eigenladung des Proteins, wodurch ein einheitliches Verhältnis von Ladung und Masse entsteht. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung bewegen sich die Proteine abhängig von ihrer Größe durch ein Polyacrylamidgel definierter Porengröße zur Anode, wobei die Laufgeschwindigkeit umgekehrt proportional zur Proteingröße ist. Vor der eigentlichen Auftrennung im Trenngel durchlaufen die Proteine ein Sammelgel, das einen relativ geringen Acrylamidgehalt (4%) und verhältnismäßig große Poren besitzt. Aufgrund des neutralen pH-Wertes kommt es hier zu einer Konzentration der Proteine an der Grenze zum Trenngel, was die spätere Ausbildung von distinkten Banden im Trenngel fördert.

Für die SDS-PAGE wurden Vertikal-Gelelektrophoresesysteme von Bio-Rad benutzt. Nach Vorbereitung der Gießstände wurde zunächst ein Trenngel (8,5% oder 12,5% Acrylamid) gegossen und mit Ethanol überschichtet. Nach 30-minütiger Polymerisation wurde der Alkohol entfernt, das Sammelgel über das Trenngel gegossen und mit einer Taschenschablone (Kamm) versehen. Nach weiteren 30 min wurde das Gel in die Elektrophoresekammer überführt und mit SDS-Elektrophoresepuffer bedeckt. Nach Entfernen des Kamms konnten die Proben aufgetragen werden. Dazu wurden Proben definierten Proteingehaltes (3-20 µg) mit Lysepuffer auf einheitliche Volumina aufgefüllt, mit 5× Laemmli-Puffer gemischt und 5-15 min bei 96 °C denaturiert. Parallel wurde eine Tasche mit einem Größenstandard (Page-Ruler Prestained Protein Ladder, Fermentas) beschickt. Nach Auftragen der Proben auf das Gel erfolgte die Gelelektrophorese bei 100 V für etwa 100 min, wobei das im Laemmli-Puffer enthaltene Bromphenolblau eine Lauffront bildete und Aufschluss über die maximale Laufweite des Proteingemisches gab. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel aus der Apparatur entfernt und weiter benutzt.

3.2.6.5. Western-Blotting

Das Protein-Blotting ermöglicht den Nachweis bestimmter Proteine durch Bindung spezifischer Antikörper und anschließende Chemilumineszenzvisualisierung. Dazu erfolgen zunächst eine SDS-Gelelektrophorese und anschließend der elektrophoretische Transfer der Proteine auf eine Membran, wo schließlich der immunchemische Nachweis erfolgt.

Für den Transfer der Proteine aus dem Polyacrylamidgel mittels Nassblotverfahren wurde zunächst eine zurecht geschnittene Polyvinylidendifluorid- (PVDF) Membran in Ethanol aktiviert und anschließend in Transferpuffer äquilibriert. Der Blot (Sandwich) wurde mit Hilfe von Kunststoffgittern, Schwammtüchern und Filterkarton wie folgt zusammengesetzt:



Um die Bildung von Luftblasen innerhalb des Blots zu vermeiden, erfolgte der Zusammenbau in einer mit Puffer gefüllten Schale. Dennoch auftretende Blasen wurden durch Rollen mit einem Glasstab entfernt. Schließlich wurden die Gitter miteinander verriegelt und das Sandwich so in die Blottingkammer (Bio-Rad) überführt, dass die Membran in Richtung Anode wies. Nach Einsetzen eines Kühlakkus und eines Magnetrührfisches wurde die Kammer mit Transferpuffer aufgefüllt. Der Transfer erfolgte unter ständigem Rühren bei 100 V für 1 h.

Anschließend wurde die Membran entnommen, kurz in PBST gespült und zur Absättigung mit Proteinen in 5% BSA-Lösung für 2 h blockiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem spezifischen Primärantikörper aus Maus oder Kaninchen (i.d.R. 1:2000 in 5% BSA-Lösung) für 2 h bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht. Anschließend wurde die Membran für 3× 10 min in TBST gespült und anschließend 90 min mit dem gegen den Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper (1:1000 in 1% Blocking-Reagenz von Lumilight, Roche in TBST) inkubiert. Nach nochmaligem 3× 10-minütigem Waschen mit TBST erfolgte eine 5-minütige Inkubation in der Lumilight-Detektionslösung im Dunkeln und die anschließende Detektion der Chemilumineszenz mit Hilfe der CCD-Kamera LAS-1000 und systemeigener Software.

Zur densitometrischen Analyse der Proteinbanden wurde die Software AIDA Raytest (Straubenhardt) verwendet.

3.2.7. Ko-Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation ermöglicht es, mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers aus einem Zelllysate ein einziges Protein zu isolieren (*pull down*). Dabei wird die Proteinprobe mit einem spezifischen Antikörper gegen ein bestimmtes Protein versetzt. Nach Zugabe von mit Protein A beschichteten Sepharose-Beads bindet Protein A an die Fc-Region des Antikörpers und es entsteht ein Komplex aus Protein, Antikörper, Protein A und Beads (Immunpräzipitat). Bei der Ko-Immunpräzipitation werden sowohl das durch den Antikörper präzipitierte Protein als auch seine Interaktionspartner erfasst. Durch anschließendes Western-Blotting und Detektion mit Antikörpern gegen potentielle Interaktionspartner können so Interaktionen zwischen verschiedenen Proteinen sichtbar gemacht werden.

Für die Ko-Immunpräzipitation wurden zunächst Zelllysate mit Hilfe eines RIPA-Puffers hergestellt. Dazu wurden konfluent gewachsene Zellschichten mit PBS gewaschen und anschließend in RIPA-Puffer abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellyse erfolgte durch 30-minütige Inkubation bei 4 °C. Anschließend wurde die Probe 15 min bei 4 °C und 15.000 ×g zentrifugiert und der Überstand gewonnen. Es erfolgte die Proteinquantifizierung nach Pierce mit Hilfe einer 20fachen Verdünnung des Extraktes. Anschließend wurden 50–250 µg des Gesamtproteins mit 2–4 µg des *pull-down*-Antikörpers versetzt und bei 4 °C über Nacht im Test-Tube-Rotator inkubiert. Protein A Agarose (von Upstate) wurde dreimal mit PBS gewaschen (Zentrifugation bei 1.000 ×g für 1 min) und zu gleichen Teilen mit PBS zu einem Agarose-*slurry* verdünnt. Anschließend wurde das Protein-Antikörper-Gemisch mit 30 µl Agarose-*slurry* versetzt und eine weitere Stunde bei 4 °C rotiert. Durch Zentrifugation (1.000 ×g, 1 min) wurden die Agarose-Beads isoliert und dreimal mit RIPA-Puffer gewaschen. Dann wurde die Probe in 2×Laemmli-Puffer aufgenommen und 20 min bei 96 °C gekocht, um das Immunpräzipitat aufzuspalten. Schließlich wurden die Beads kurz durch Zentrifugation bei 14.000 ×g pelletiert. Der Überstand wurde mit einer Hamilton-Spritze auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen und Western-Blotting und Immundetektion unterzogen.

3.2.8. Immunfluoreszenz und konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Immunfluoreszenzfärbung und anschließende Laserscanning-Mikroskopie ermöglichen die Lokalisation von Proteinen im Zellverband durch Visualisation mit Hilfe von spezifischen Antikörpern.

Dafür wurden konfluent bewachsene Zellkultur-Filtereinsätze, Deckgläschen oder Zellkulturschalen zunächst mit PBS gewaschen und mit eiskaltem absoluten Ethanol oder Methanol bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für mindestens 20 min fixiert und dehydriert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen in 1% Triton-X-100 ad PBS 7 min permeabilisiert. Es folgten wiederholtes Waschen mit PBS und die Blockierung freier Proteinbindungsstellen mit Blockierungslösung (5% Ziegen-Serum in PBS) für 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte nacheinander die Inkubation mit zwei verschiedenen spezifischen Primärantikörpern (i. d. R. 1 h, 1:100 in Blockierungslösung bei Raumtemperatur), wobei ein Antikörper aus der Maus, der andere aus dem Kaninchen stammte. Zwischen und nach den Inkubationsschritten wurde mit Blockierungslösung gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit zwei verschiedenen gegen die Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörpern (Alexa) inkubiert (1 h, 1:500 in Blockierungslösung bei Raumtemperatur im Dunkeln), wobei Anti-Maus- und Anti-Kaninchen-Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoffen unterschiedlicher Wellenlängen (488 oder 594 nm) markiert waren. Schließlich erfolgten erneutes Waschen mit Blockierungslösung und 10-minütige Färbung der Zellkerne mit DAPI (1:1000 in Blockierungslösung bei Raumtemperatur). Anschließend wurden die Zellen nacheinander in Blockierungslösung, Wasser und Ethanol gespült, mittels ProTags MountFluor (Biocyc) eingedeckt und im Dunkeln aufbewahrt.

Nach Aushärten wurden die Präparationen mit Hilfe eines Laserscanning-Mikroskops und dazugehöriger Software (LSM 510 Meta, Zeiss) analysiert. Dabei wurden die an die Sekundärantikörper gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe sowie DAPI mit Hilfe von monochromatischem Licht definierter Wellenlänge angeregt und emittierten wiederum Licht der Wellenlängen 408 nm (blau, DAPI), 488 nm (grün) oder 594 nm (rot). Kolokalisierte Strukturen erschienen gemäß additiver Farbmischung blaugrün, violett oder gelb. Die Laserscanning-Technik ermöglichte die Analyse einer definierten Schicht des Präparats. Mit Hilfe von sogenannten Z-Achsen-Scans wurden nacheinander verschiedene Schichten definierter Tiefe aufgenommen, so dass neben der Längen- und Breitenachse (X und Y) die Tiefenachse (Z) dargestellt und somit eine dreidimensionale Sicht auf das Präparat ermöglicht wurde.

3.2.9. Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie

Die Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie ermöglicht die Abbildung komplexer zellulärer Strukturen auf subzellulärer Ebene. Bei der hier verwendeten Gefrierbruch-Methode entsteht eine durch das hydrophobe Membraninnere verlaufende Bruchlinie, wobei die Bruchflächen in P-Fläche (auf der protoplasmatischen Seite) und E-Fläche (auf der exoplasmatischen

Seite) unterschieden werden können. Die Tight Junction zeichnet sich auf jeweils einer Seite als erhabene Struktur, auf der anderen Seite als komplementäre Vertiefung ab.

Für den Gefrierbruch wurden konfluent gewachsene Zellen zunächst in PBS gewaschen und mit Glutaraldehydpuffer für 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Danach erfolgte die Dehydrierung des Präparates in zwei aufeinander folgenden Schritten in 10% und 30% Glycerol bei jeweils 30 min. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Skalpell vom Filter entfernt und in einen Gefrierbruchhalter überführt, der in mit flüssigem Stickstoff gefülltem Freon 22 eingefroren wurde. Danach erfolgten die Fixierung in der sogenannten Clamping-Nut und der Einbau in das auf $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlte Gefrierbruchgerät (Denton Vacuum, Moorestown, USA). Hier wurde die Clamping-Nut unter einem Vakuum von $2 \cdot 10^{-7}$ Torr bei $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ geöffnet, was das Brechen der Membran zur Folge hatte. Durch um 45° versetztes Bedampfen mit Platin und Kohlenstoff unter Vakuum und Kühlung erfolgte die Herstellung von Replica. Anschließend wurden die Replica für 1 h in Natriumhypochlorit inkubiert, auf Kupfernetze überführt und mit Amylacetat gewaschen.

Die Analyse der Replica erfolgte mit Hilfe eines Transemissionselektronenmikroskops (Zeiss 902) und systemeigener Software (Olympus Soft Imaging Solution, Veleta). Für die Auswertung der Tight Junction-Morphologie wurde bei 51.000-facher Vergrößerung ein virtuelles Netzgitter mit 200 nm-Intervallen an den am weitesten apikal gelegenen Strang der Tight Junction angelegt, mit dessen Hilfe die vertikale Netzausdehnung gemessen und die horizontalen Stränge gezählt wurden. Außerdem wurde die Gesamtheit aller Stränge einer analysierten Tight Junction entweder als kontinuierlich oder als partikelartig (diskontinuierlich) klassifiziert. Strangdiskontinuitäten von mehr als 20 nm Länge wurden als Strangbrüche definiert und als Anzahl pro μm registriert.

3.2.10. Elektrophysiologische Methoden

3.2.10.1. Ussing-Kammer-Technik

Die Ussing-Kammer-Technik erlaubt die kontinuierliche Messung elektrophysiologischer Parameter wie des transepithelialen Widerstandes (R^t), der Spannung (U^e) oder des aktiven Ionentransports (Kurzschlussstrom, I_{sc}) an Epithelien. Die Ussing-Kammer (nach dem dänischen Physiologen Hans Ussing, 1911-2000) besteht aus zwei mit elektrolythaltiger Flüssigkeit („Ringer-Lösung“) gefüllten Teilkammern, die durch das zu vermessende Epithel voneinander getrennt sind (Abb. 10). Die Aufrechterhaltung von physiologischen Bedingungen erfolgt durch Gewährleistung einer konstanten Temperatur und eines stabilen pH-Werts durch Begasung mit Carbogen (95% O_2 , 5% CO_2). Die Begasung ermöglicht

zudem eine ständige Durchmischung der Ringer-Lösung. Jede Kammerseite verfügt über eine Strom- und eine Spannungselektrode, die an eine computergesteuerte Spannungsmess- und Stromeinspeiseeinheit angeschlossen sind. Abhängig von der Modifikation der Ussing-Kammer können verschiedene Gewebe oder Zellkultureinsätze verwendet werden.

Durch die Gabe eines Stromes (Stromklemme) entsteht über dem Epithel eine Potentialdifferenz, die proportional zum durch das Epithel vermittelten elektrischen Widerstand ist. Aufgrund des Ohm'schen Gesetzes $R = U / I$ wird ausgehend von der gemessenen Potentialdifferenz der transepitheliale Widerstand R^t berechnet.

Bestimmte Fragestellungen erfordern außerdem die Anwendung der Spannungsklemme, die die Konstanzhaltung der Spannung durch eine durch Rückkopplung geregelte Stromzufuhr ermöglicht. Insbesondere kann auf diese Weise der Kurzschlussstrom I_{SC} bestimmt werden, indem genau soviel Strom zugeführt wird, dass die Potentialdifferenz über dem Epithel Null beträgt, wobei die Menge des dafür eingesetzten Stromes dem aktiven Ionentransport entspricht.

Zur Steuerung und Datenaufnahme diente eine eigens entwickelte Software (Analogon, Ing. grad. D. Sorgenfrei).

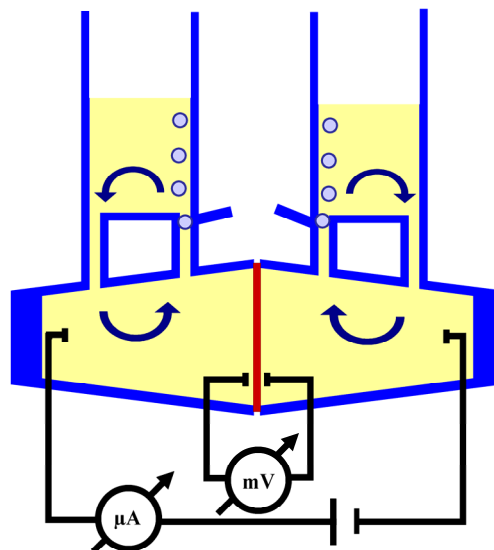


Abb. 10: Schematische Darstellung einer Ussing-Kammer.

3.2.10.2. Vorbereitung der Messung

Vor jeder Messung wurde die auf 37 °C temperierte Ussing-Kammer leer mit Wasser gespült und mit der zu verwendenden Ringer-Lösung befüllt. Es erfolgte eine Aufnahme von

Potentialdifferenz und Widerstand des leeren Bades. Die ermittelten Werte wurden von den späteren Messwerten abgezogen. Danach wurde die Kammer wieder geleert und ein konfluent bewachsenes Zellkulturinsert vorsichtig eingebaut. Nach Zugabe von Ringer-Lösung auf der apikalen und basolateralen Seite, Entfernen etwaiger Luftblasen und der Regulation der Gaszufuhr wurde die Messung der elektrophysiologischen Parameter gestartet. Das eigentliche Experiment wurde nach einer kurzen Phase der Äquilibration der Zellen begonnen.

3.2.10.3. Messung von Dilutionspotentialen

Die Messung von Dilutionspotentialen dient der Bestimmung der Permeabilitäten für Na^+ und Cl^- . Dazu werden beide Ionen auf einer Seite bei gleichzeitigem osmotischen Ausgleich durch Mannitol ersetzt. Der so erzeugte Gradient führt zum Durchtritt von Na^+ und/oder Cl^- durch das Epithel, wodurch sich eine bestimmte Potentialdifferenz, das Dilutionspotential einstellt (Abb. 11).

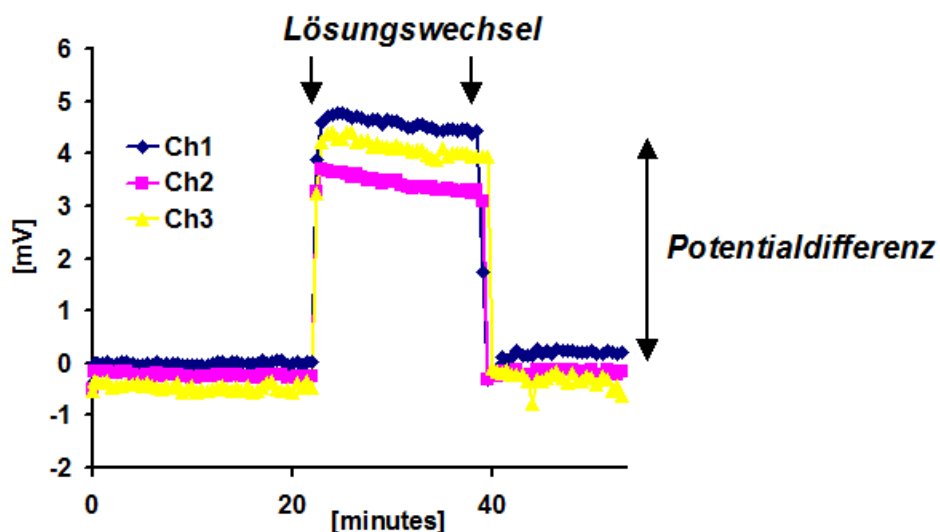


Abb. 11: Darstellung einer typischen Messung des Dilutionspotentials. Durch einseitigen Austausch von Natrium und Chlorid und die dadurch ausgelöste Ionenbewegung stellt sich eine Potentialdifferenz ein, anhand derer das Verhältnis der Permeabilitäten für beide Ionen berechnet werden kann. Abgebildet sind drei Kammer, bei denen zunächst auf der basolateralen, dann auf der apikalen Seite ein Lösungswechsel zu Mannitol-Ringer vorgenommen wurde. Durch den zweiten Lösungswechsel stellt sich das Ausgangspotential wieder ein.

Das Dilutionspotential ergibt sich aus der Goldman-Hodkin-Katz-Gleichung:

$$U_m = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{P_{Na}[Na]^{ap} + P_{Cl}[Cl]^{bl}}{P_{Na}[Na]^{bl} + P_{Cl}[Cl]^{ap}}$$

Dilutionspotential (basolateral gegen apikal)

U_m

R universelle Gaskonstante

T Temperatur

F Faradaykonstante

P_{Na}, P_{Cl} Permeabilität für die Ionen Natrium bzw. Chlorid

$[Na]^{ap}, [Cl]^{ap}$ apikale Konzentration von Natrium bzw. Chlorid

$[Na]^{bl}, [Cl]^{bl}$ basolaterale Konzentration von Natrium bzw. Chlorid

Durch Auflösen nach P_{Na}/P_{Cl} kann das Verhältnis der relativen Permeabilitäten für Na^+ und Cl^- berechnet werden:

$$\frac{P_{Na}}{P_{Cl}} = \frac{e^{\frac{U_m \cdot F}{R \cdot T}} \cdot [Cl]^{ap} - [Cl]^{bl}}{[Na]^{ap} - e^{\frac{U_m \cdot F}{R \cdot T}} - [Na]^{bl}}$$

Aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung der Badlösung auf beiden Seiten entsteht an den Elektroden ein Liquid-Junction-Potential, das berücksichtigt werden muss:

$$\frac{P_{Na}}{P_{Cl}} = \frac{10^{\frac{\Delta E}{s}} \cdot a_{Cl-ap} - a_{Cl-bl}}{a_{Na-ap} - 10^{\frac{\Delta E}{s}} - a_{Na-bl}}$$

ΔE $\Delta E = E_{bl} - E_{ap}$, mit Korrektur für das Liquid-Junction-Potential

s $s = 2,303 \cdot \frac{R \cdot T}{F}$

a_{Na-ap}, a_{Cl-ap} apikale Ionenaktivitäten für Natrium bzw. Chlorid

a_{Na-bl}, a_{Cl-bl} basolaterale Ionenaktivität für Natrium bzw. Chlorid

Die absoluten Permeabilitäten für Na^+ und Cl^- können nun mit Hilfe der Gesamtleitfähigkeit des Epithels (G^t) berechnet werden, welche dem Kehrwert des transepithelialen Widerstandes entspricht:

$$P_{\text{Na}} = \frac{R \cdot T}{F^2} \cdot \frac{G^t}{[\text{NaCl}]} \cdot \frac{1}{1 + P_{\text{Na}} / P_{\text{Cl}}} \cdot \frac{P_{\text{Na}}}{P_{\text{Cl}}}$$

$$P_{\text{Cl}} = \frac{R \cdot T}{F^2} \cdot \frac{G^t}{[\text{NaCl}]} \cdot \frac{1}{1 + P_{\text{Na}} / P_{\text{Cl}}}$$

Für die Messung des Dilutionspotentials wurden die Zellkultureinsätze wie unter 3.2.10.2. beschrieben in die Kammer eingebaut. Die Kammerhälften wurden mit je 10 ml Natrium-Ringer-Lösung befüllt und mit Carbogen begast. Nachdem sich ein konstanter Widerstand eingestellt hatte, wurden entweder apikal oder basolateral 5 ml der Natrium-Ringer-Lösung durch NaCl-reduzierte Mannitol-Ringer-Lösung ersetzt und das Dilutionspotential gemessen.

3.2.10.4. Messung von biionischen Potentialen

Monovalente Kationen

Die Messung von biionischen Potentialen ermöglicht die Berechnung von Permeabilitäten für verschiedene An- und Kationen. Dafür wird Na^+ oder Cl^- auf einer Badseite durch ein anderes An- oder Kation ersetzt. Der experimentelle Ablauf entsprach dem der Dilutionspotentialmessung.

Die relativen Permeabilitäten für monovalente Kationen X^+ (Li^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+) ergaben sich wie folgt:

$$\frac{P_{\text{X}}}{P_{\text{Na}}} = \frac{a_{\text{Na-ap}} + P_{\text{Cl}} / P_{\text{Na}} \cdot a_{\text{Cl-bl}} - 10^{\frac{\Delta E}{s}} \cdot (a_{\text{Na-bl}} + P_{\text{Cl}} / P_{\text{Na}} \cdot a_{\text{Cl-ap}})}{10^{\frac{\Delta E}{s}} \cdot a_{\text{x-bl}} - a_{\text{x-ap}}}$$

Divalente Kationen

Bei der Bestimmung der Permeabilitäten für divalente Kationen X^{2+} wurden Natriumhydrogencarbonat-freie Ringer-Lösungen verwendet, um eine Prezipitation von Carbonatsalzen zu vermeiden. Außerdem wurde die Lösung mit reinem Sauerstoff begast. Zunächst wurde wie oben (3.2.10.3.) beschrieben das Dilutionspotential durch Austausch gegen mannitolhaltige Ringer-Lösung auf der basolateralen Seite bestimmt, um für die spätere Berechnung verwendet zu werden. Danach erfolgte der apikale Austausch von 5 ml Natrium-Ringer gegen eine Mg^{2+} -, Ca^{2+} -, Sr^{2+} - oder Ba^{2+} -haltige Ringer-Lösung. Die relativen Ionenpermeabilitäten wurden wie folgt berechnet:

$$\frac{P_X}{P_{Na}} = \frac{-n_{Na} - P_{Cl} / P_{Na} \cdot n_{Cl} \cdot z_{Cl}}{n_x \cdot z_x} \quad \text{mit} \quad n = z \cdot \frac{\Delta E}{s} \cdot \frac{a_{bl} \cdot 10^{\frac{z \cdot \Delta E}{s}} - a_{ap}}{10^{\frac{z \cdot \Delta E}{s}} - 1}$$

z Ladungszahl des Ions

Monovalente Anionen

Die Messung der Permeabilitäten für monovalente Anionen Y^- erfolgte ebenfalls unter Natriumhydrogencarbonat-freien Bedingungen und unter O_2 -Begasung. Analog zur Bestimmung der Permeabilität für divalente Kationen wurde zunächst das Dilutionspotential und anschließend das biionische Potential ermittelt. Die Berechnung der relativen Ionenpermeabilitäten für F^- , Cl^- , Br^- und I^- erfolgte nach folgender Gleichung:

$$\frac{P_Y}{P_{Cl}} = \frac{P_{Na} / P_{Cl} \cdot a_{Na-ap} + a_{Cl-bl} - 10^{\frac{\Delta E}{s}} \cdot (P_{Na} / P_{Cl} \cdot a_{Na-bl} + a_{Cl-ap})}{10^{\frac{\Delta E}{s}} \cdot a_{Y-ap} - a_{Y-bl}}$$

Ausgehend von den relativen Permeabilitäten für Kat- und Anionen konnten die absoluten Permeabilitäten berechnet werden.

3.2.10.5. Fluxmessungen parazellulärer Größenmarker

Zur Bestimmung der Permeabilitäten für größere Solute wurden Fluxmessungen mit parazellulären Größenmarkern durchgeführt. Diese Messungen erfolgten ebenfalls mit Hilfe der Ussing-Kammer, um elektrophysiologische Parameter während der Messung zu kontrollieren und um durch kontinuierliche Durchmischung der Ringer-Lösung die Entstehung von Grenzschichten höherer Konzentration zu vermeiden. Um einen etwaigen Einfluss sich ändernder Potentiale auszuschalten, fanden alle Fluxmessungen unter Anlegen der Spannungsklemme statt.

Fluoreszein

Für die Bestimmung der Fluoreszein-Permeabilität wurden beide Kammerhälften mit je 10 ml Standard-Ringer-Lösung befüllt. Dann wurde die Spannungsklemme angelegt. Vor Beginn der Messung wurden basolateral 300 µl der Kammerlösung entnommen und ersetzt. Nach apikaler Zugabe von 10 µl Fluoreszein (100 mM) wurden alle 10 min für einen Gesamtzeitraum von 40 min basolateral 300 µl entnommen und ersetzt. Die Bestimmung der Fluoreszein-Konzentration erfolgte spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 520 nm. Der Flux wurde wie folgt berechnet:

$$J = \frac{(c_2 - c_1) \cdot V_{Kammer}}{\Delta t \cdot A_{Filter} \cdot \left(\frac{V_{Zugabe}}{V_{Kammer}} \right)}$$

J	Flux
c ₁ , c ₂	Konzentrationen zum Zeitpunkt 1, 2
Δt	Zeitintervall
V	Volumen der Kammer bzw. Zugabevolumen des Soluts
A	Fläche des Epithels

Ausgehend von Flux und Konzentration eines Soluts kann seine Permeabilität bestimmt werden:

$$P = \frac{J}{\Delta c}$$

 Δc

Konzentration des Soluts auf der Zugabeseite

FITC-Dextran 4000

Der Einsatz Fluoreszenz-gekoppelter Dextrane ermöglicht es, den Durchtritt von Makromolekülen durch die Tight Junction zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Fluoreszeinisothiocyanat- (FITC)-Dextran mit einem Molekulargewicht von 4000 Da (FD-4) verwendet.

Die experimentelle Prozedur zur Bestimmung der Permeabilität für FD-4 entsprach grundsätzlich der für Fluoreszein angewandten Methode. Jedoch betrug das Volumen an Ringer-Lösung pro Kammerhälfte nur 5 ml, das Zugabevolumen 50 μ l (20 mM). Die Zeitintervalle zwischen den Abnahmen maßen je 30 min und die Gesamtdauer der Messung betrug 2 h. Die basolaterale Kammerseite enthielt außerdem unmarkiertes Dextran, dessen Konzentration der des FITC-Dextrans auf der apikalen Seite entsprach. Um einen Einfluss kurzketziger FITC-Dextrane auf das Messergebnis auszuschließen, wurde die FITC-Dextran-Stammlösung vor Gebrauch mit Hilfe eines Dialyseschlauches definierter Porengröße über Nacht bei 4 °C dialysiert.

3.2.10.6. Messung des Wasserflusses

Um die Permeabilität für Wasser zu bestimmen, wurden modifizierte Ussing-Kammern benutzt, die mit zwei separaten Glasröhren anstelle der Gas-Lifts ausgestattet waren. Eine konstante Temperatur von 37 °C sowie die Zirkulation in den Kammerhälften mittels einer Rotationspumpe wurden gewährleistet. Die Kammer wurde mit konfluent bewachsenen Zellkultureinsätzen bestückt und mit HEPES-Ringer-Lösung gefüllt. Vor der Messung wurde die Spannungsklemme eingesetzt und ein osmotischer Gradient mit Hilfe von Mannitol (Endkonzentration 100 mM) angelegt, um den Durchtritt von Wasser zu induzieren. Vor und während der Messung wurde der Flüssigkeitsspiegel in den beiden Glasröhren in 15-minütigen Intervallen über einen Zeitraum von zwei Stunden aufgenommen. Die Änderung der Meniski ermöglichte die Berechnung des Wasserflusses und der Permeabilität:

$$P = J / \Delta c$$

P	Permeabilität
J	Flux
Δc	Konzentration des Soluts auf der Zugabeseite

3.2.10.7. Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie

Die Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie ermöglicht die Messung des transepithelialen Widerstandes bei gleichzeitiger Unterscheidung zwischen trans- und parazellulärer Komponente, wobei letztere durch die Eigenschaften der Tight Junction bestimmt wird. Die Zellmembran lässt sich als Kondensator mit parallel geschaltetem transzellulären Widerstand (R^{trans}) darstellen, während parallel dazu der parazelluläre Widerstand (R^{para}) geschaltet ist. In Serie dazu ist der subzelluläre Widerstand (R^{sub}) geschaltet, der sich aus der Filterfläche des Zellkultureinsatzes ergibt. Während der Applikation eines Wechselstroms ($35 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, Frequenzbereich von 1,3 Hz bis 65 kHz), wird die Spannungsänderung mit Hilfe eines phasensensitiven Verstärkers (402 frequency response analyzer, Beran Instruments; 1286 electrochemical interface; Solartron Schlumberger) gemessen.

Die graphische Darstellung der erhaltenen Messwerte erfolgt in einem Nyquist-Diagramm. Dabei werden die Imaginärteile der komplexen Impedanzen, die die kapazitiven Eigenschaften des Epithels darstellen, gegen die Realteile der komplexen Impedanzen, die dem Ohm'schen Widerstand entsprechen, aufgetragen. Die Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie kombiniert die klassische Impedanzmessung mit der Modifikation des parazellulären Widerstandes durch Öffnung der Tight Junction mit dem Kalziumchelator EGTA (Kalzium-Switch) sowie der Messung des Fluxes eines parazellulären Markers wie Fluoreszein. Durch das Öffnen der Tight Junction steigt der Fluoreszein-Flux, während der epitheliale Widerstand R^{epi} sinkt. Mit Hilfe der Fluxverhältnisse sowie der Impedanzmessung vor und nach Kalzium-Switch können trans- und parazellulärer Widerstand ermittelt werden (Krug et al., 2009).

Für die Messung wurden Zellkultureinsätze direkt in eine modifizierte Ussing-Kammer eingesetzt oder aber zuvor mit Hilfe von Histoacryl-Kleber auf kleine Plastikringe geklebt. Die Kammerhälften wurden mit je 10 ml Standard-Ringer-Lösung befüllt und mit Carbogen begast. Zwischen den einzelnen Impedanzmesspunkten wurden die transepithelialen Potentiale auf 0 mV geklemmt. Während der Impedanzmessung wurde sequentiell sinusförmiger Wechselstrom angelegt. Die daraus resultierenden Spannungsänderungen

wurden gemessen und die Impedanzwerte aufgezeichnet. In 10-minütigen Abständen wurden Impedanzspektren aufgenommen, wobei nach einer ersten Messung die Zugabe von Fluoreszein und die regelmäßige Abnahme von Proben erfolgte. Nach der dritten Messung nach Fluoreszein-Gabe wurde beidseitig EGTA in einer Endkonzentration von 1,3 mM appliziert. Anschließend erfolgte die weitere Aufnahme von Impedanzspektren in 10-minütigen Messintervallen. Die Messung der Fluoreszein-Fluxe erfolgte ähnlich der oben beschriebenen (3.2.10.5.) Methode, wobei die einzelnen Abnahmen jeweils zwischen den Aufnahmen der Impedanzspektren erfolgten.

3.2.11. Statistik

Alle Messwerte wurden als arithmetisches Mittel \pm SEM (*standard error of the mean*) angegeben, wobei n der Anzahl der Experimente entsprach. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit Hilfe des t-Tests für ungepaarte Stichproben. Bei Analysen von mehr als zwei Stichproben wurde die Bonferroni-Holm-Korrektur angewandt. Mit Hilfe der Irrtumswahrscheinlichkeit p wurde die Signifikanz eines Ergebnisses ermittelt, wobei ein Resultat als signifikant bewertet wurde, wenn p weniger als 0,05 betrug (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

4. Ergebnisse

4.1 Funktionelle Charakterisierung des Tight Junction-Proteins

Claudin-3

4.1.1. Claudin-3-Überexpression oder –Defizienz in verschiedenen Zellkultursystemen

Um die spezifische Funktion des humanen Claudin-3-Proteins in der Tight Junction zu analysieren, wurden einerseits Überexpressionsklone verschiedener Zelllinien mit schwacher endogener Claudin-3-Expression (MDCK II, rbTAL, CaCo-2) generiert, andererseits wurden Claudin-3-defiziente Klone einer Zelllinie mit deutlicher Claudin-3-Expression (MDCK C7) mittels RNA-Interferenz erzeugt (Abb. 12).

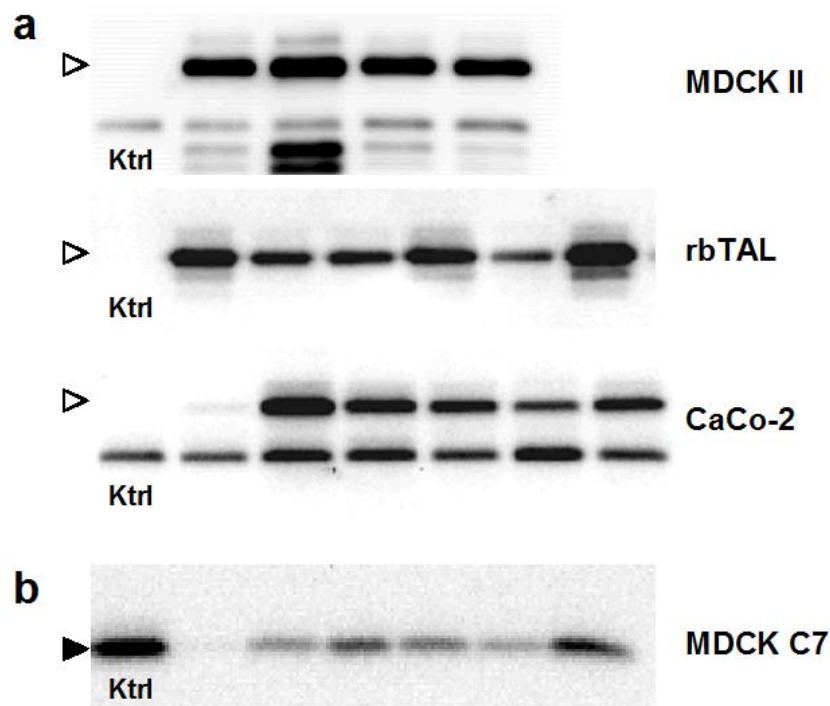


Abb. 12: Expression von Claudin-3 in transgenen Zellen. **a** Auswahl an Claudin-3-Überexpressionsklonen der Zelllinien MDCK II, rbTAL und CaCo-2. Der weiße Pfeil zeigt die Bande des exogenen Claudin-3 an. **b** Claudin-3-Knock-down in MDCK C7. Ktrl = mit Leervektor transfizierte Kontrolle.

MDCK-Zellen wurden ursprünglich aus einer Hundeniere gewonnen. MDCK II stellt einen lecken Subklon dieser Nieren-Zelllinie dar und verfügt über einen verhältnismäßig niedrigen parazellulären Widerstand, was hauptsächlich auf die starke Expression des porenbildenden Tight Junction-Proteins Claudin-2 zurückzuführen ist. Die rbTAL-Zelllinie entstammt dem Sammelrohr der Kaninchenniere und ist durch Expression von wenig Tight Junction-Komponenten gekennzeichnet. CaCo-2-Zellen sind aus einem humanen Colon-Karzinom isoliert worden und verfügen über einen höheren parazellulären Widerstand als MDCK II. Die für die RNA-Interferenz-Experimente verwendeten MDCK C7-Zellen stellen einen hochohmigen Subklon der MDCK-Zelllinie dar, besitzen also einen hohen transepithelialen Widerstand (R^t).

4.1.1.1. Überexpression von Claudin-3 in MDCK II, rbTAL und CaCo-2

Für die Expression des humanen Claudin-3 in MDCK II und CaCo-2 wurde humane Claudin-3-cDNA in den Expressionsvektor p3xFLAG-CMV-10 kloniert. Da rbTAL-Zellen über eine Neomycin-Resistenz verfügen, wurde für die Expression in diesen Zellen der Hygromycin-Resistenz-markierte Vektor pcDNA3.1/Hygro verwendet. Die Transfektion mit Claudin-3-cDNA führte in allen drei Zelllinien zu deutlicher heterologer Expression von Claudin-3-Protein in einer Vielzahl von Klonen. Repräsentative Klone mit starker exogener Claudin-3-Expression wurden auf permeable Zellkultureinsätze ausgesät und für die elektrophysiologische Analyse verwendet.

Während MDCK II-Zellen drei bis vier Tage nach der Aussaat konfluent gewachsen waren und einen relativ stabilen transepithelialen Widerstand ausbildeten, dauerte die Zelldifferenzierung der rbTAL- und CaCo-2-Klone etwa zwei bis vier Wochen, innerhalb derer der R^t starken Schwankungen in beide Richtungen unterworfen war und kein deutliches Plateau ausbildete. Zudem schien die Differenzierung bei den verschiedenen Klonen und auch bei unterschiedlichen Aussaaten verschieden schnell zu erfolgen. Im CaCo-2-Modell waren außerdem starke Schwankungen in der Protein-Expressionsstärke anderer Tight Junction-Moleküle wie Claudin-1, Claudin-4 oder Claudin-7 abhängig vom Zeitpunkt der Präparation und zwischen einzelnen Klonen zu verzeichnen. Der Einsatz anders beschaffener Zellkultureinsätze mit unterschiedlicher Porengröße (0,4 – 3 μm) führte nicht zur Ausbildung eines Widerstandsplateaus. Da sowohl ein solches Plateau als auch die gleichmäßige Expression von Claudinen Voraussetzung für eine reproduzierbare und verlässliche Messung elektrophysiologischer Größen sind, wurde von weiteren Analysen an rbTAL- und CaCo-2-Klonen abgesehen und ausschließlich MDCK II als Modell für die Überexpression verwendet.

4.1.1.2. Knock-Down von Claudin-3 in MDCK C7

Für den Knock-Down des caninen Claudin-3-Gens in MDCK C7-Zellen wurden zwei *small hairpin*-RNA-Sequenzen (shRNA) verwendet, die im Rahmen einer Studie von Hou et al. (2006) bereits erfolgreich zur Claudin-3-Defizienz in MDCK II-Zellen geführt hatten (Hou et al., 2006). Diese Sequenzen wurden zunächst in den shRNA-Expressionsvektor pRNATin-H1.2/Hygro (Genscript) kloniert, der die Expression von shRNA unter Kontrolle des Polymerase-III-Promotors H1 ermöglicht. Ein Screening der mit den beiden Konstrukten transfizierten Zellen ergab, dass die Transfektion nicht zu einer Abnahme der Protein-Expression von Claudin-3 führte, obwohl das Vorhandensein des Vektors anhand der grünen GFP-Fluoreszenz nachgewiesen wurde. Da Hou et al. die Konstrukte mit Hilfe eines anderen Expressionssystems und dem humanen U6-Promotor erfolgreich benutzt hatten, sollten die Konstrukte in einem weiteren Ansatz unter der Kontrolle des U6-Promotors exprimiert werden. Um gleichzeitig die Vorteile des Marker-Gens für das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) auf dem pRNATin-H1.2/Hygro-Vektor und den U6-Promotor nutzen zu können, wurde der H1.2-Promotor aus dem Vektor entfernt und durch den U6-Promotor ersetzt. Die Transfektion der sh-RNA-Sequenzen unter Kontrolle des U6-Promotors führte zu einer mäßigen bis deutlichen Reduktion der Claudin-3-Expression in MDCK C7 (Abb. 12).

Bei der funktionellen Analyse der erhaltenen Klone ergab sich ein ähnliches Problem, wie bei den Überexpressionsklonen der Zelllinien rbTAL und CaCo-2. Die transepithelialen Widerstände der Zellen variierten stark zwischen den einzelnen Aussaaten sowie zwischen Klonen mit ähnlich stark dezimiertem Claudin-3-Protein (ca. 420-6000 $\Omega \cdot \text{cm}^2$). Das Fehlen eines deutlichen Widerstandsplateaus, wie es üblicherweise bei MDCK C7-Zellen zu beobachten ist, erschwerte es, eindeutige Aussagen zur funktionellen Bedeutung der Claudin-3-Defizienz in diesen Zellen zu treffen. Aus diesem Grund war es nicht möglich, einen eventuell vorhandenen Effekt auf die Dichtheit der Tight Junction aufzulösen und es wurden auch an diesem Zellmodell keine weiterführenden Messungen vorgenommen.

4.1.2. Stabile Überexpression von humanem Claudin-3 in MDCK II

MDCK II-Zellen wurden mit humaner Claudin-3-cDNA aus CaCo-2-Zellen transfiziert, die am 5'-Ende mit einer 3xFLAG-Sequenz markiert war. Zellen, die parallel mit dem leeren Vektor transfiziert wurden, dienten als Kontrollen. Die stabile Transfektion führte zu einer starken Expression von humanem, N-terminal mit dem FLAG-Peptid markierten Claudin-3-Protein in einer Vielzahl von Klonen (Abb. 12). Die Analyse mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie ergab eine deutliche Zunahme von Claudin-3 in der Tight Junction, wie durch

die Kolo-kalisation mit dem Tight Junction-Marker Occludin bestätigt wurde (Abb. 13, 14). Da der gegen Claudin-3 gerichtete Antikörper in der Lage war, sowohl das humane, als auch das canine Claudin-3-Protein zu binden, wurde die korrekte Lokalisation des exogenen Claudin-3 durch die Verwendung eines gegen das FLAG-Peptid gerichteten Antikörpers abgesichert.

Um eine eventuelle Einflussnahme anderer Tight Junction-Proteine auf die Ergebnisse der funktionellen Analysen zu untersuchen, wurden die erhaltenen Klone auf eventuelle Veränderungen der Expression von Occludin sowie der Claudine 1, 2, 4, 5, 7 und 8 überprüft. Es zeigte sich, dass die Expression von Occludin, Claudin-1, -4, -7 und -8 nicht signifikant verändert waren, während Claudin-5 gar nicht exprimiert war. Im Gegensatz dazu variierten die Klone stark hinsichtlich der Expression von Claudin-2, das typischerweise sehr stark in der Tight Junction von MDCK II-Zellen vertreten ist. Die Mehrzahl der Claudin-3-transfizierten Klone zeigte eine starke Reduktion von Claudin-2 oder erwarb eine Claudin-2-Abnahme durch wiederholtes Passagieren der Zellen. Die Leervektor-transfizierten Zellen zeigten größtenteils eine normal hohe Claudin-2-Expression, obwohl auch Klone mit reduziertem Claudin-2 zu finden waren.

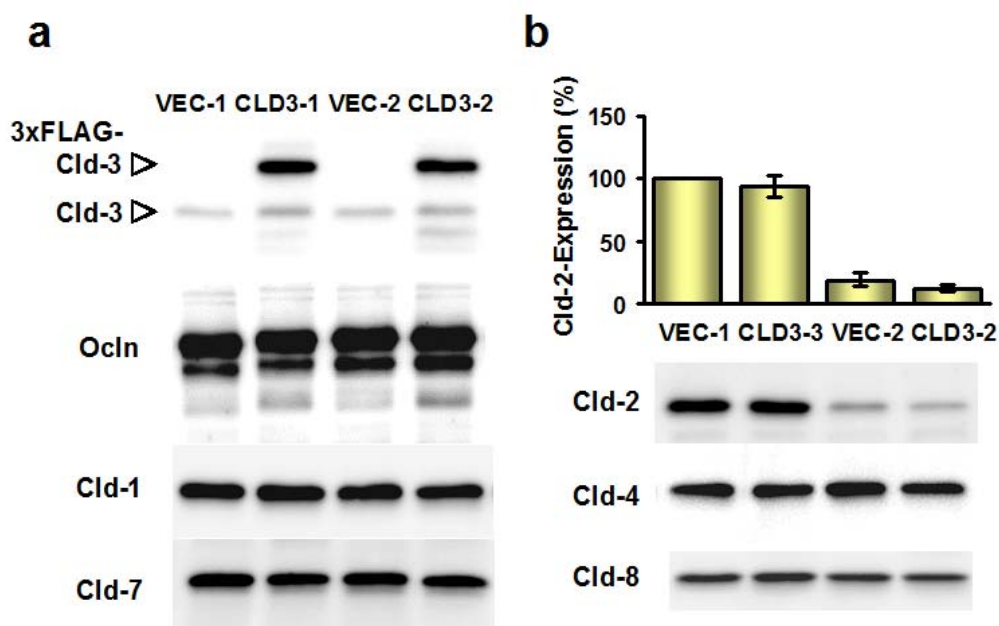


Abb. 13: Expression von Tight Junction-Proteinen in Claudin-3-transfizierten Zellen und Vektor-Kontrollen. **a** Die obere Bande auf dem Claudin-3-Blot repräsentiert exogenes, mit 3xFLAG markiertes Claudin-3, die niedrige Bande hingegen die endogene Expression. **b** Densitometrische Analyse der Claudin-2-Expression in den Zellsystemen mit starker (VEC-1, CLD3-1) bzw. schwacher (VEC-2, CLD3-2) Claudin-2-Expression relativ zu Klon VEC-1, der typische MDCK-Zellen repräsentiert.

Aus diesem Grund wurden für die weitere Analyse zwei Klonsysteme verwendet, die sich hinsichtlich ihrer Claudin-2-Expression unterschieden: Einerseits wurden eine Vektor-Kontrolle (VEC-1) und zwei Claudin-3-Überexpressionsklone (CLD3-1a and CLD3-1b) ausgewählt, die über ein hohes Claudin-2-Expressionsniveau verfügten, wie es typischerweise in MDCK II-Zellen gefunden wird (Klonsystem 1). Darüber hinaus wurden zwei weitere Vektor-Kontrollen (VEC-2a, VEC-2b) und zwei Claudin-3-exprimierende Klone (CLD3-2a, CLD3-2b) selektiert, deren Claudin-2-Expression auf ca. 16 % reduziert war (Klonsystem 2, Abb. 13). Die Effekte der Claudin-3-Überexpression auf die parazelluläre Barriere wurden jeweils in beiden Klonsystemen mit starker oder schwacher Claudin-2-Expression analysiert und die Daten den jeweiligen Vektor-Kontrollen gegenüber gestellt, wobei die Expressionsstärke des heterogenen Claudin-3 in allen ausgewählten Überexpressionsklonen gleich stark war.

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Experimente an jeweils zwei Klonen der Gruppen CLD3-1, VEC-2 und CLD3-2 durchgeführt und die Ergebnisse eines repräsentativen Klons gezeigt. Aus der Gruppe der Vektor-Kontrollen mit normal starker Claudin-2-Expression (VEC-1), wurde nur ein Klon verwendet, da dieser Klon den typischen MDCK II-Zellen ähnelt, welche bereits gut charakterisiert sind.

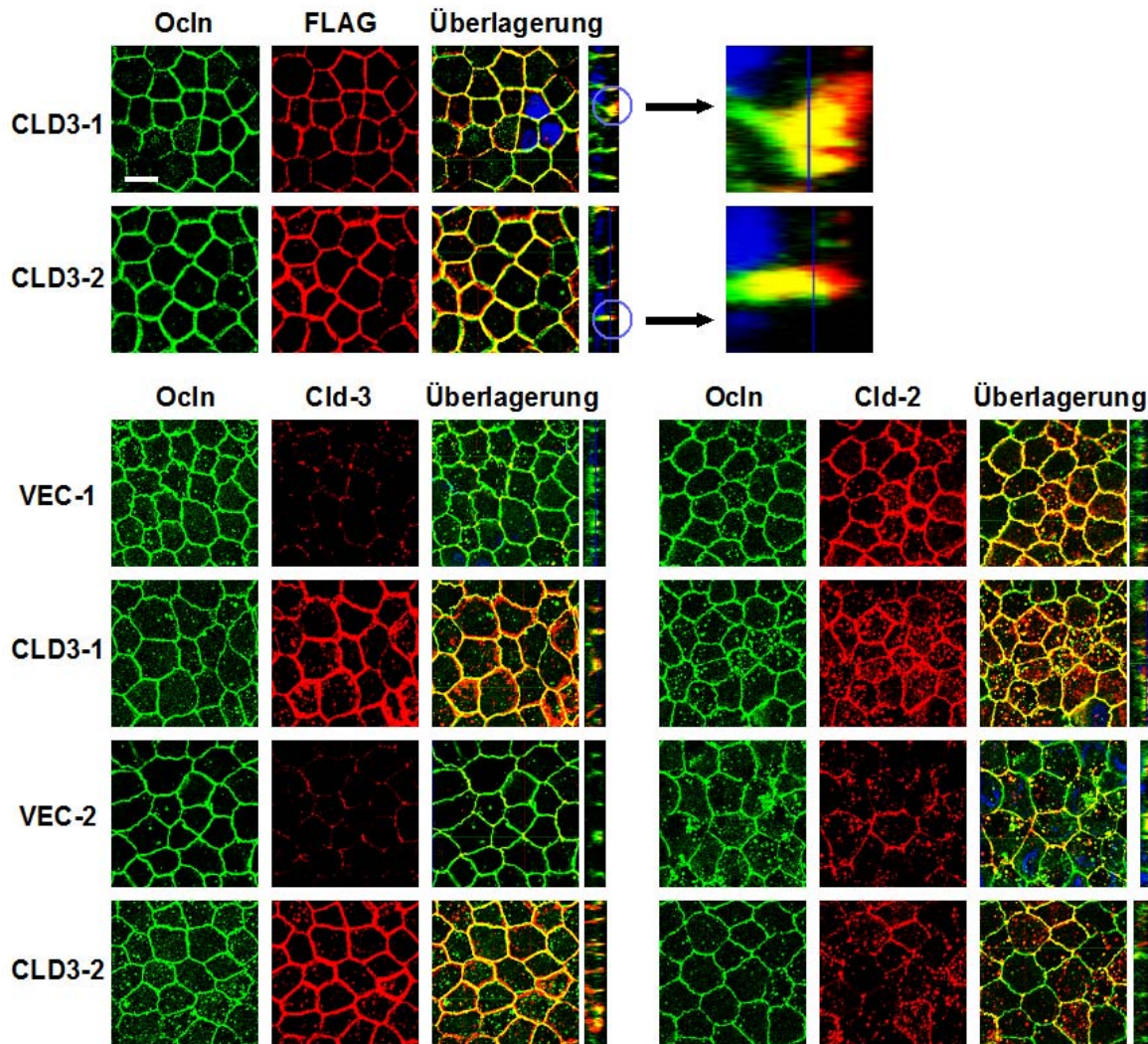


Abb. 14: Immunfluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen der Claudin-3-exprimierenden Klone und Vektor-Kontrollen. Gezeigt sind zweidimensionale Aufnahmen sowie die Lateralansicht (Z-Achse). Claudin-3 (Cld-3) und Claudin-2 (Cld-2) kolokalisieren mit dem Tight Junction-Marker Occludin (Ocln). MDCK II-Zellen exprimieren wenig endogenes Claudin-3, die korrekte Lokalisation des heterogenen Claudin-3 wurde mittels Färbung gegen das FLAG-Signal überprüft. Balken = 10 μm .

4.1.3. Analyse der Tight Junction-Ultrastruktur

Um Aufschluss über einen eventuellen Einfluss der Claudin-3-Überexpression auf die Ultrastruktur der Tight Junction zu erhalten, wurden Gefrierbruch-elektronenmikroskopische Aufnahmen der selektierten Klone analysiert.

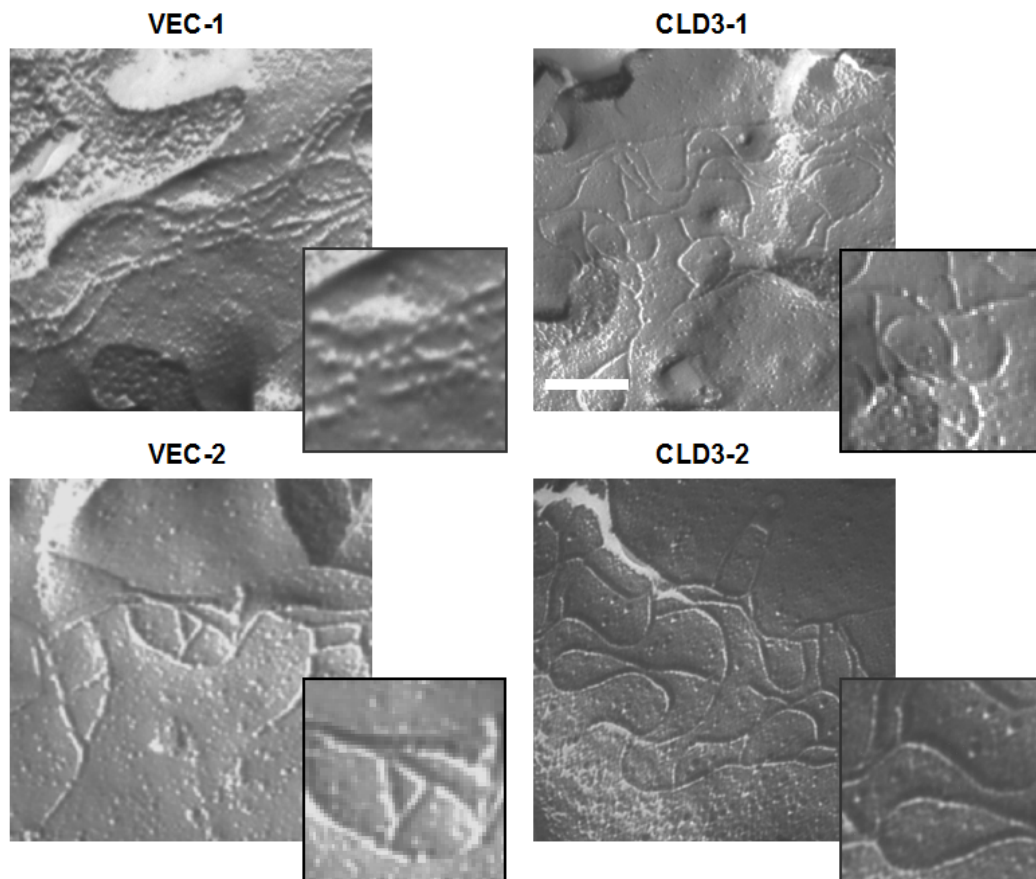


Abb. 15: Gefrierbruch-elektronenmikroskopische Aufnahme von Vektor-Kontrollen und Claudin-3-exprimierenden Zellen. Die Claudin-3-Transfektion führte zu einer erhöhten Komplexität des Tight Junction-Strangmusters durch die Bildung von kontinuierlichen Strängen mit kurvig-rundlichem Erscheinungsbild. Balken = 200 nm.

In beiden Klonsystemen mit hoher und niedriger Claudin-2-Expression führte die Transfektion mit Claudin-3 zu einer sehr deutlichen Änderung des Tight Junction-Strangmusters. Während die Tight Junction der Vektor-Kontrollen ausschließlich aus linearen Strängen aufgebaut war, zeigten die Claudin-3-überexprimierenden Zellen vornehmlich ein Netzwerk aus kurvigen Strängen mit der Ausbildung großer Schleifen (Abb. 15). Die Analyse von jeweils 11-15 verschiedenen Aufnahmen pro Klon ergab, dass die durchschnittliche Zahl der horizontalen Stränge pro Tight Junction in allen Klonen etwa gleich war und zwischen 4 und 5 betrug (Tab. 1). In den Claudin-3-transfizierten Zellen führte die Ausbildung des charakteristisch kurvigen Strangmusters jedoch zu einer stärkeren vertikalen Ausdehnung des Netzwerks und somit zu einer verminderten Netzwerkdichte, wobei dieser Effekt im Klonsystem 1 mit starker Claudin-2-Expression etwas deutlicher ausgeprägt war (Abb. 16). Die Auszählung der Strangbrüche ergab deutliche Unterschiede zwischen Klonsystem 1 und 2: Während Strangbrüche von mehr als 20 nm in VEC-1 mit

starker Claudin-2-Präsenz relativ häufig vorkamen, verfügte VEC-2 mit erniedrigter Claudin-2-Expression über eine dem gegenüber deutlich verminderte Zahl von Strangbrüchen. Die Überexpression von Claudin-3 führte in Klonsystem 1 zu einer starken Reduktion der Strangbrüche, hatte aber in Klonsystem 2 keinen weiteren Einfluss auf das ohnehin sehr seltene Vorkommen von Strangbrüchen. Die Beschaffenheit der Tight Junction-Stränge lässt sich im allgemeinen als kontinuierlich oder eher perlschnur- oder partikelartig klassifizieren. In beiden Klonsystemen führte die Claudin-3-Überexpression zu einem völligen Verschwinden der Partikelartigkeit von Strängen zugunsten eines kontinuierlichen Strangmusters (Abb. 15, 16). In Klonsystem 1 war dieser Effekt etwas deutlicher ausgeprägt als in Klonsystem 2, wo die Claudin-2-Reduktion bereits zu einer Abnahme der Partikelartigkeit von Tight Junction-Strängen führte.

Insgesamt führte die Überexpression von Claudin-3 also zu einer Zunahme der Komplexität der Tight Junction-Ultrastruktur.

Tab. 1: Analyse der Tight Junction-Ultrastruktur in Vektor-Kontrollen und Claudin-3-transfizierten Zellen

	VEC-1	CLD3-1	VEC-2	CLD3-2
Strangzahl	4,29±0,23	4,50±0,33	4,75±0,32	4,94±0,33
Netzwerktiefe (nm)	255,54±17,11	371,11±41,29	331,56±37,43	429,41±38,34
Strangdichte (1/pm)	17,45±1,55	12,13±1,61	14,33±1,89	11,51±1,28
Strangbrüche pro µm	1,64±0,13	0,06±0,06	0,16±0,05	0,27±0,10
Verhältnis partikelartig: kontinuierlich	6:7	0:11	5:10	0:12
Verhältnis geradlinig:kurvig	12:0	1:9	14:0	2:10

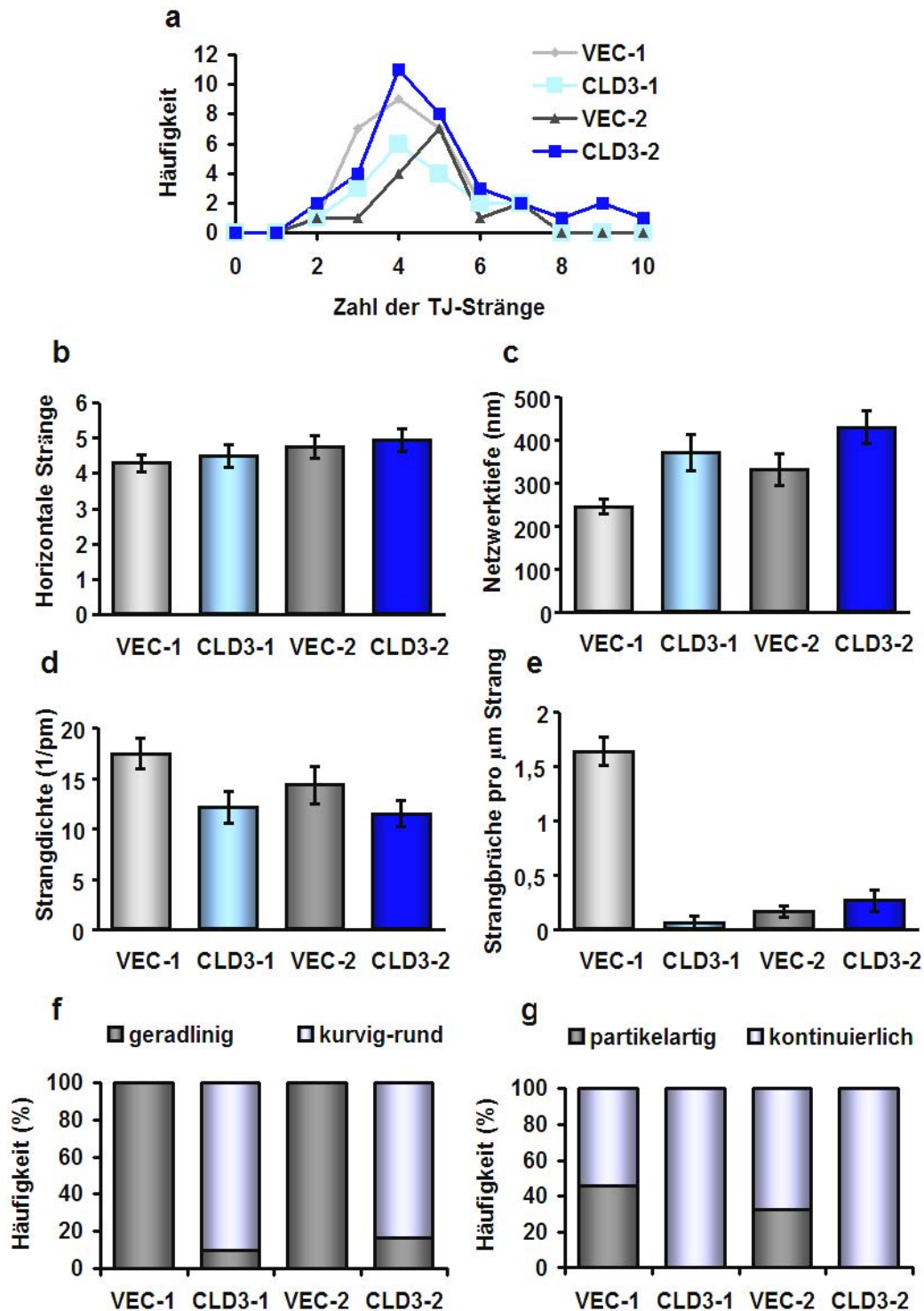


Abb. 16: Analyse der Tight Junction-Ultrastruktur in Vektor-Kontrollen und Claudin-3-transfizierten Zellen. Die Claudin-3-Überexpression hatte keinen Einfluss auf die Zahl der Tight Junction-Stränge (a, b), führte aber zur Ausprägung eines charakteristischen kurvig-runden Strangmusters (f), wodurch die Netzwerkausdehnung zunahm (c) und die Strangdicke leicht abnahm (d). Außerdem resultierte die Claudin-3-Transfektion in einer Abnahme der Strangbrüche (e) und einem vollständigen Verschwinden von Strangdiskontinuitäten zugunsten kontinuierlicher Stränge (g). Die Claudin-2-Reduktion führte ebenfalls zu einer Abnahme der Strangbrüche.

4.1.4. Effekt auf den parazellulären und epithelialen Widerstand

Die transepitheliale Leitfähigkeit ist das Reziproke des epithelialen Widerstandes und ergibt sich aus der Summe der transzellulären und der parazellulären Leitfähigkeit, wobei letztere durch die Beschaffenheit der Tight Junction bestimmt wird. Um den spezifischen Effekt der Überexpression von Claudin-3 auf den parazellulären Widerstand zu untersuchen, wurde die Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie verwendet, welche die Messung des parazellulären (R^{para}) und des transzellulären Widerstandes (R^{trans}) als Teile des epithelialen Widerstandes (R^{epi}) ermöglicht (Krug et al., 2009).

Grundsätzlich zeigte sich ein Einfluss der Claudin-2-Expression auf den parazellulären und damit auch auf den epithelialen Gesamtwiderstand. Während R^{para} und R^{epi} im Klon VEC-1 jeweils $37 \pm 6 \, \Omega \cdot \text{cm}^2$ und $22 \pm 3 \, \Omega \cdot \text{cm}^2$ betrugen, zeigte Klon VEC-2 einen demgegenüber erhöhten R^{para} von $105 \pm 18 \, \Omega \cdot \text{cm}^2$ und einen R^{epi} von $44 \pm 4 \, \Omega \cdot \text{cm}^2$ (Abb. 17). Diese Beobachtung entspricht der Erkenntnis, dass Claudin-2 einen parazellulären Porenbildner darstellt und die Durchlässigkeit für Ionen erhöht. Dies äußerte sich in einer Verminderung des parazellulären Widerstandes und infolgedessen des epithelialen Widerstandes.

In den beiden Klonsystemen mit starker und schwacher Claudin-2-Expression führte die Claudin-3-Überexpression zu einem deutlich erhöhten epithelialen Widerstand ($79 \pm 3 \, \Omega \cdot \text{cm}^2$ in CLD3-1 und $119 \pm 9 \, \Omega \cdot \text{cm}^2$ in CLD3-2). Diese Zunahme war durch einen im Vergleich mit den jeweiligen Vektor-Kontrollen mehr als zehnfachen Anstieg des parazellulären Widerstandes bedingt ($549 \pm 66 \, \Omega \cdot \text{cm}^2$ in CLD3-1 und $1192 \pm 200 \, \Omega \cdot \text{cm}^2$ in CLD3-2; Abb. 17). Diese Beobachtung zeigt, dass Claudin-3 die Barrierefunktion der Tight Junction stärkt, indem es die Durchlässigkeit für Ionen herabsetzt. Anders als Claudin-2 hat es also eine abdichtende Funktion.

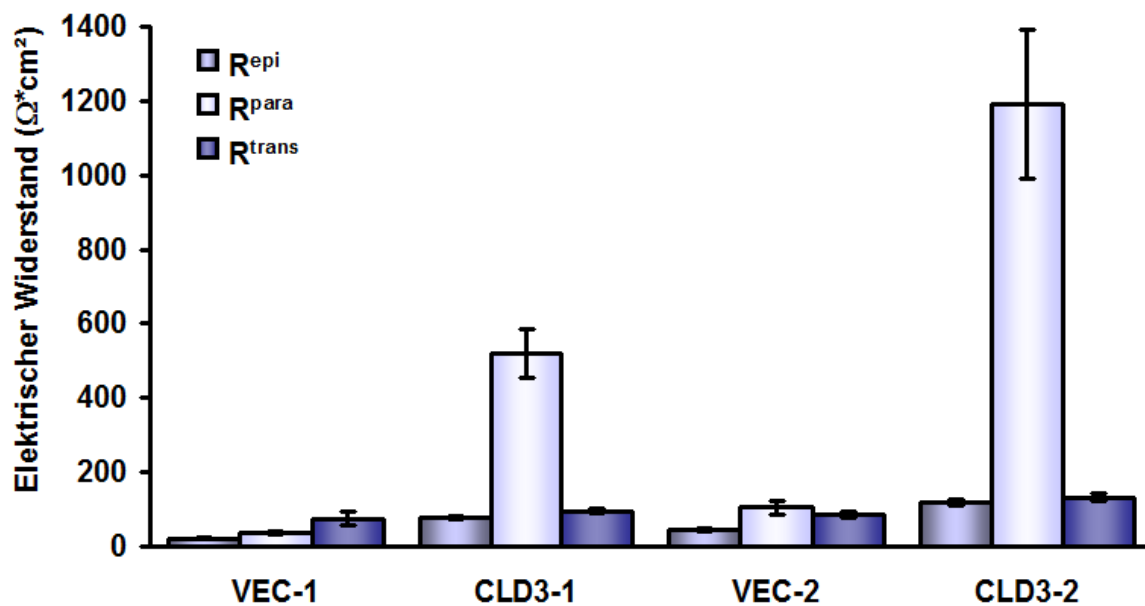


Abb. 17: Ergebnis der Zwei-Wege-Impedanz-Spektroskopie. Claudin-3-Überexpression erhöhte den epithelialen Widerstand (R^{epi}), basierend auf einem deutlich verstärkten parazellulären Widerstand (R^{para}).

Im Klonsystem 2 bewirkte die Überexpression von Claudin-3 neben der starken Erhöhung des parazellulären Widerstandes auch eine mäßige Zunahme des transzellulären Widerstandes. Obwohl die Ursache für diesen Effekt unklar ist, kann ein Einfluss auf die Ergebnisse der Potentialmessungen zur Bestimmung der Ionenpermeabilität ausgeschlossen werden: Zum einen wurde das Potential sehr kurz nach dem Lösungswechsel bestimmt. Zum anderen wurde sichergestellt, dass die Potentialdifferenz unabhängig davon war, in welcher Richtung der Ionenaustausch stattfand. Ein transzellulärer Transport über Kanäle, Carrier oder Transzytose würde deutlich länger dauern und gerichtet verlaufen.

4.1.5. Analyse der Permeabilität für Natrium und Chlorid

Die Erhöhung des parazellulären Widerstandes kann durch das Abdichten gegenüber Kationen, Anionen oder beiden Ionensorten verursacht sein. Um den Anteil der einzelnen Ionenpermeabilitäten am Effekt auf den Widerstand zu untersuchen, wurden Dilutionspotential-Messungen durchgeführt.

Die Messungen ergaben, dass Klon VEC-1, welcher typische MDCK II-Zellen repräsentiert, eine relativ hohe Permeabilität für Natrium ($37,0 \pm 0,8 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$) und eine dem gegenüber

verhältnismäßig niedrige Permeabilität für Chlorid ($11,2 \pm 0,8 \cdot 10^{-6}$ cm/s) besaß (Abb. 18 a). Dieses Ergebnis ist auf die starke Expression von Claudin-2 in diesen Zellen zurückzuführen. Claudin-2 ist ein porenbildendes Tight Junction-Protein, das eine hohe Permeabilität für Natrium und andere einwertige Kationen besitzt, den Durchtritt von Anionen aber nicht vermittelt (Amasheh et al., 2002). Das Verhältnis P_{Na}/P_{Cl} , das Aufschluss über die Ladungsselektivität eines Epithels gibt, betrug in VEC-1 $3,4 \pm 0,2$. Bei Klon CLD3-1 wurden Natrium- und Chlorid-Permeabilitäten von jeweils $14,2 \pm 0,4 \cdot 10^{-6}$ cm/s und $8,0 \pm 0,4 \cdot 10^{-6}$ cm/s gemessen, was einem Verhältnis P_{Na}/P_{Cl} von $1,8 \pm 0,1$ entsprach (Abb. 18 b). Die Überexpression von Claudin-3 im Claudin-2-starken Klonssystem 1 führte also zu einer deutlichen Abnahme der Permeabilität für Natrium, während die Permeabilität für Chlorid weniger stark herabgesetzt war, gleichbedeutend mit einer Abnahme der Kationenselektivität.

Die Vektor-Kontrollen des Klonssystems 2 mit schwacher endogener Claudin-2-Expression zeigten eine im Vergleich mit VEC-1 niedrige Natrium-Permeabilität (VEC-2: $18,6 \pm 1,1 \cdot 10^{-6}$ cm/s), während die Permeabilität für Chlorid ähnlich gering war wie bei VEC-1 (VEC-2: $11,3 \pm 0,8 \cdot 10^{-6}$ cm/s). Das Verhältnis P_{Na}/P_{Cl} war mit $1,7 \pm 0,1$ relativ niedrig und zeigte einen Verlust der Kationenselektivität in diesen Zellen an, der auf die reduzierte Claudin-2-Expression zurückzuführen war. Die Claudin-3-Überexpression im Klonssystem 2 resultierte in verminderten Permeabilitäten für Natrium- (CLD3-2: $8,1 \pm 0,8$ cm/s) und Chlorid-Ionen (CLD3-2: $4,9 \pm 0,7 \cdot 10^{-6}$ cm/s). In diesem Zellsystem hatte die Überexpression von Claudin-3 keinen Einfluss auf P_{Na}/P_{Cl} (CLD3-2: $1,7 \pm 0,1$). Anders als in Klonssystem 1 dichtete Claudin-3 hier also gleichermaßen gegen Kationen und Anionen ab. Der Unterschied zwischen beiden Klonssystemen hinsichtlich der Claudin-3-vermittelten Änderung der Ladungsselektivität deutet auf eine Abhängigkeit des Effektes von der endogenen Claudin-2-Expression bzw. der Kationenselektivität hin.

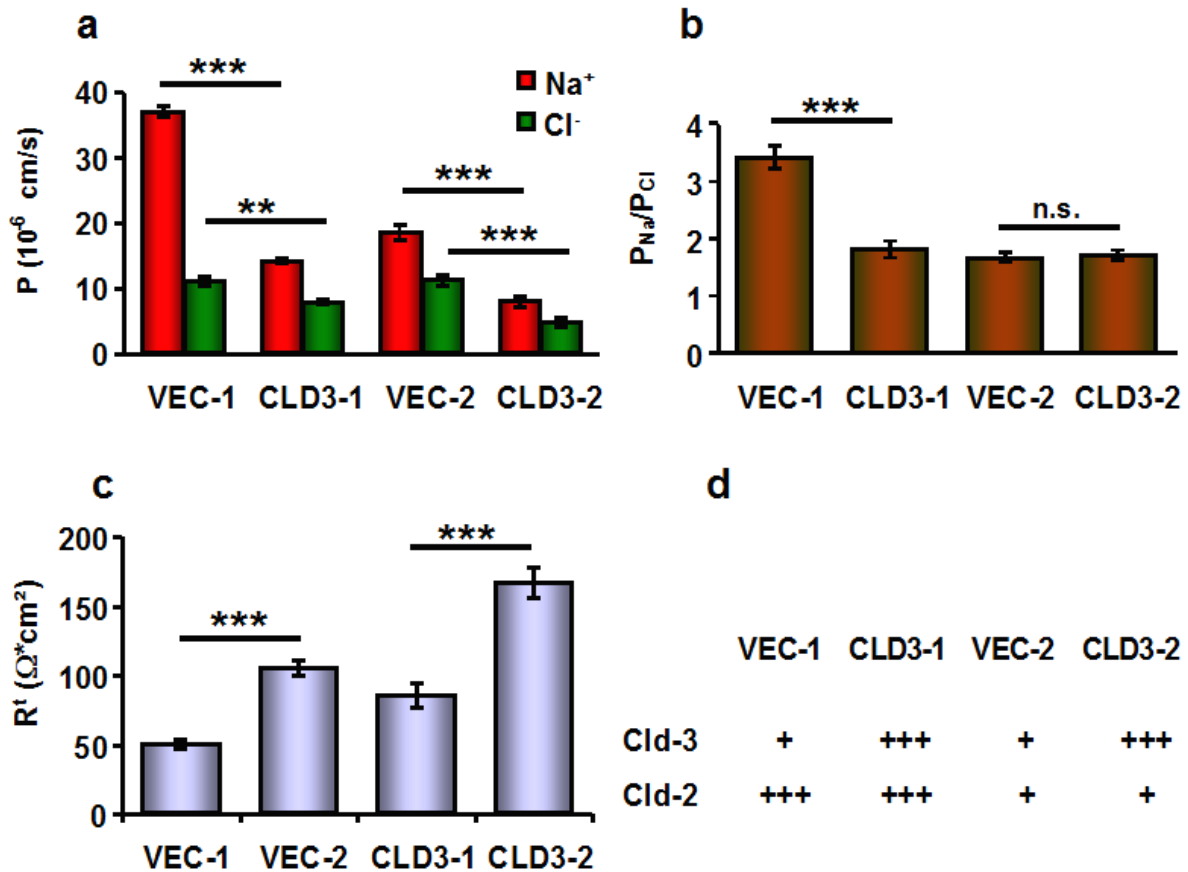


Abb. 18: Permeabilitäten für Na^+ and Cl^- (a), Verhältnis $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$ (b), transepithelialer Widerstand aus Dilutionspotential-Messungen (c) in den verschiedenen Klonen. Die unterschiedliche Claudin-2- und Claudin-3-Expression ist durch Pluszeichen dargestellt (d). Bei den Vektor-Kontrollen verursachte die Claudin-2-Reduktion eine Verminderung der Selektivität für Kationen, während die Claudin-2-Expressionsstärke in den Claudin-3-transfizierten Zellen scheinbar keinen Einfluss auf $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$ hatte. Im Claudin-2-depletierten Zellsystem führte die Überexpression von Claudin-3 zur Abnahme der Permeabilität für beide Ionen ohne Änderung des Verhältnisses $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s.: $p > 0,05$.

4.1.6. Analyse der Permeabilität für verschiedene Kationen und Anionen

Um zu untersuchen, inwieweit der die Tight Junction abdichtende Effekt der Claudin-3-Überexpression auch für andere Kat- und Anionen außer Natrium und Chlorid gilt, wurden Permeabilitätsmessungen für verschiedene mono- und divalente Kationen sowie Anionen durchgeführt. Die Reihung der Permeabilitäten verschiedener Ionen ermöglicht Rückschlüsse auf die Eigenschaften der parazellulären Poren. Für die Messungen wurde jeweils nur ein Klon aus jeder der vier Gruppen verwendet, also je eine Vektor-Kontrolle und ein Überexpressionsklon aus den Klonsystemen 1 und 2 (VEC-1, CLD3-1a, VEC-2a, CLD3-2a).

Abb. 19 a zeigt die Ergebnisse der biionischen Potentialmessungen für die Alkalimetalle Lithium (Li^+), Kalium (K^+), Natrium (Na^+), Rubidium (Rb^+) und Cäsium (Cs^+). Diese Ionen unterscheiden sich hinsichtlich ihres Ionenradius und des Radius ihrer Hydrathülle, wobei die Ionenradien in der Reihenfolge $\text{Li}^+ - \text{K}^+ - \text{Na}^+ - \text{Rb}^+ - \text{Cs}^+$ zunehmen, die Radien des hydrierten Ions aber abnehmen. Grundsätzlich können Ionen die Tight Junction in hydriertem oder unhydriertem Zustand passieren, abhängig von Größe und Ladung der parazellulären Poren.

Die Messungen ergaben für VEC-1 Permeabilitäten für Li^+ , K^+ , Rb^+ und Cs^+ von $34,5 \pm 0,5$; $36,7 \pm 0,1$; $34,4 \pm 0,2$ und $28,5 \pm 0,7 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ und damit eine deutliche Reihung der Permeabilitäten: $\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Li}^+ = \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+$. Diese Reihung entspricht der Eisenman-Sequenz VIII oder IX für monovalente Kationen (Abb. 20). Tendenziell traten hier die Ionen mit einem kleineren Ionenradius und einer größeren Hydrathülle stärker durch als die Ionen mit einem größeren Ionenradius. Eine Ausnahme bildete Lithium, für das die Tight Junction trotz des kleinsten Ionenradius wegen seiner sehr großen Hydrathülle nur mäßig permeabel war. Daraus lässt sich schließen, dass der parazelluläre Durchtritt monovalenter Kationen in Klon VEC-1 größtenteils in unhydriertem Zustand erfolgte, was in erster Linie auf die spezifischen Eigenschaften der hier dominanten Claudin-2-Pore zurückzuführen ist.

Die Permeabilitäten im Überexpressionsklon CLD3-1 betrugen $13,3 \pm 0,1$; $13,9 \pm 0,1$; $12,8 \pm 0,3$ und $11,5 \pm 0,4 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ für Li^+ , K^+ , Rb^+ und Cs^+ . Die Überexpression von Claudin-3 im Klonsystem 1 führte also zu einer deutlichen Abnahme der Permeabilitäten für alle Erdalkalimetalle, wobei die Reihung der Permeabilitäten weniger deutlich war als in VEC-1, aber grundsätzlich unverändert blieb.

VEC-2 zeigte geringere Permeabilitäten für monovalente Kationen als VEC-1 (VEC-2: $17,9 \pm 0,1$; $18,1 \pm 0,04$; $17,2 \pm 0,2$; $15,2 \pm 0,3 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ für Li^+ , K^+ , Rb^+ und Cs^+), was der verhältnismäßig geringeren Expression der Kationenpore Claudin-2 entsprach. Klon CLD3-2 wies mit $7,9 \pm 0,04$; $8,1 \pm 0,03$; $7,5 \pm 0,08$ und $6,1 \pm 0,05 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ die geringsten Permeabilitäten für Li^+ , K^+ , Rb^+ und Cs^+ auf. Wie in Klonsystem 1 führte die Claudin-3-Überexpression in Klonsystem 2 ebenfalls zu einer Abnahme aller Permeabilitäten, wobei die Reihung für

Erdalkalimetalle jedoch unverändert blieb. Daraus lässt sich schließen, dass Claudin-3 für alle monovalenten Kationen gleichermaßen abdichtend wirkt und den parazellulären Weg undurchlässiger macht, die Präferenz des Ionendurchtritts innerhalb der Gruppe der monovalenten Kationen aber nicht beeinflusst.

Die Messungen der Permeabilitäten für divalente Kationen ergaben insgesamt niedrigere Werte als für monovalente Kationen (Abb. 19 b). Die Permeabilitäten betrugen für Magnesium (Mg^{2+}), Kalzium (Ca^{2+}), Strontium (Sr^{2+}) und Barium (Ba^{2+}) bei VEC-1 jeweils $7,0 \pm 1,1$; $10,9 \pm 1,7$; $10,6 \pm 1,3$; und $10,4 \pm 1,7 \cdot 10^{-6}$ cm/s. Ähnlich wie bei Alkalimetallen lässt sich auch für Erdalkalimetalle eine Reihenfolge der Permeabilitäten feststellen, die Aufschluss über die Eigenschaften der parazellulären Poren gegenüber dieser Ionensorte geben kann. Allerdings war bei VEC-1 wie auch bei den anderen Klonen keine eindeutige Reihenfolge aufzulösen, obwohl die Permeabilität für Mg^{2+} bei VEC-1 mit Abstand geringer war als für die drei anderen untersuchten Ionen. Dies weist auf die Sequenzen I, II oder III der Reihung für divalente Kationen (Abb. 20) hin und lässt darauf schließen, dass diese Ionen die Tight Junction eher in hydriertem Zustand passieren. Die bei Klon CLD3-1 gemessenen Permeabilitäten betrugen $6,3 \pm 0,4$; $6,5 \pm 0,2$; $6,6 \pm 0,3$ und $6,7 \pm 0,3 \cdot 10^{-6}$ cm/s für Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} und Ba^{2+} . VEC-2 zeigte im Vergleich mit VEC-1 nur geringfügig verminderte Permeabilitäten von $7,0 \pm 1,7$; $8,4 \pm 1,4$; $8,3 \pm 0,8$ und $9,2 \pm 1,3 \cdot 10^{-6}$ cm/s für Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} und Ba^{2+} . Das Fehlen von Claudin-2 schien also allenfalls einen kleinen Einfluss auf die Permeabilität für divalente Kationen zu haben, die bereits unter starker Claudin-2-Expression relativ niedrig war. Bei CLD3-2 betrugen die Permeabilitäten für Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} und Ba^{2+} jeweils $3,7 \pm 0,7$; $4,1 \pm 1,1$; $4,4 \pm 0,7$ und $4,3 \pm 0,7 \cdot 10^{-6}$ cm/s. Die Überexpression von Claudin-3 führte also bei beiden Klonsystemen zu einer Abnahme der Permeabilität für alle divalenten Kationen. Eine deutliche Reihung der Permeabilitäten entsprechend der Sequenz für Erdalkalimetalle war nicht erkennbar.

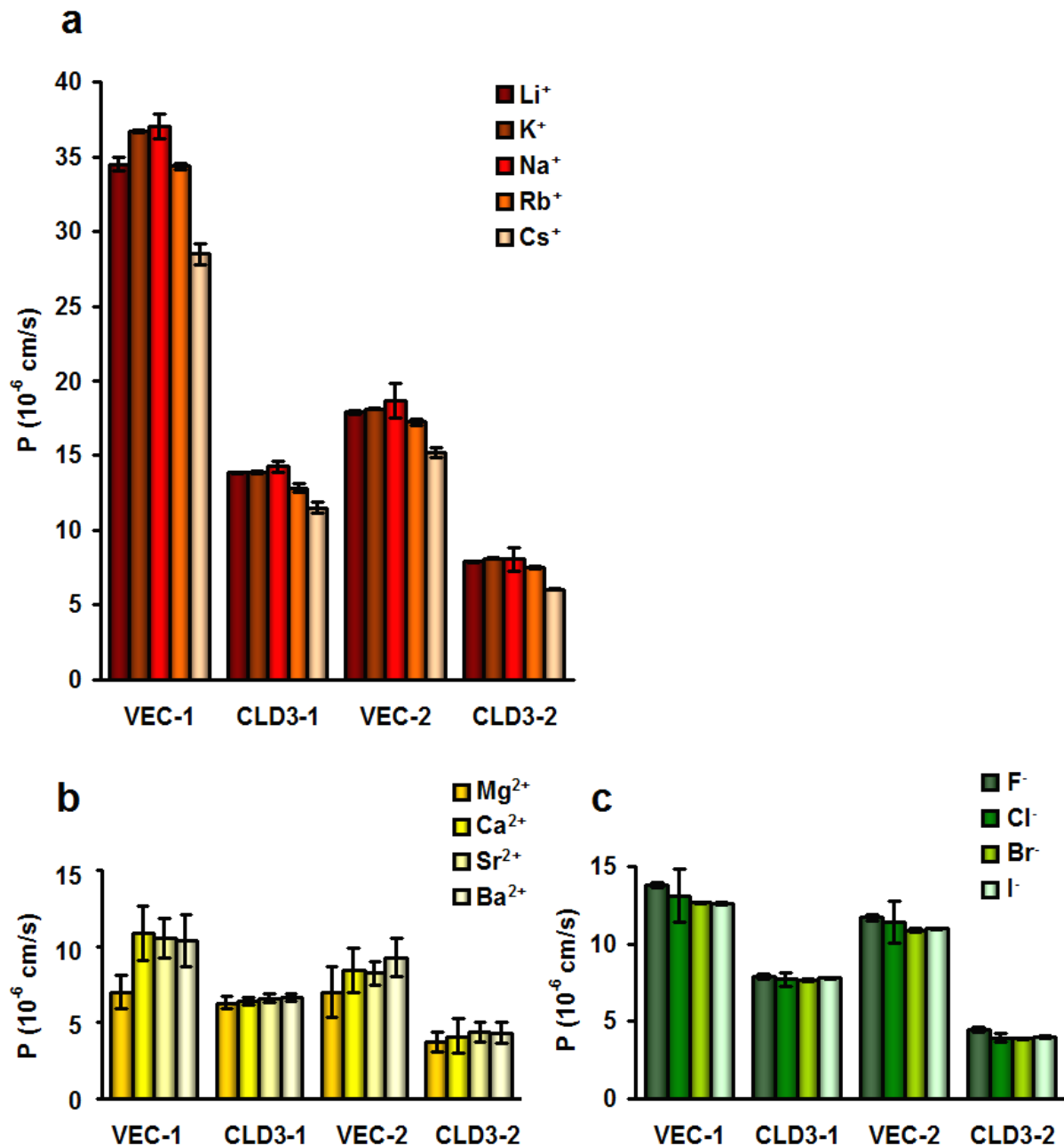


Abb. 19: Permeabilitäten für einwertige (a) und zweiwertige (b) Kationen sowie für einwertige Anionen (c) in Vektor-Kontrollen und in Claudin-3-transfizierten Klonen. Die Überexpression von Claudin-3 führte zu verminderter Permeabilität für alle Ionensorten, wobei die Reihung nicht verändert war.

Um zu untersuchen, inwieweit die abdichtende Funktion von Claudin-3 auch für andere Anionen außer Chlorid gilt, wurden Permeabilitäten für Fluorid (F⁻), Bromid (Br⁻) und Iodid (I⁻) gemessen. Um die Resultate direkt mit den Ergebnissen für Chlorid vergleichen zu können, wurde parallel die Permeabilität für Chlorid (Cl⁻) unter den entsprechenden experimentellen Bedingungen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 19 c dargestellt und ergaben folgende Permeabilitäten für F⁻, Cl⁻, Br⁻ und I⁻: $13,8 \pm 0,2$; $13,1 \pm 1,7$; $12,6 \pm 0,1$ und $12,6 \pm 0,1 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$

bei VEC-1; $7,9 \pm 0,2$; $7,7 \pm 0,5$; $7,7 \pm 0,1$ und $7,8 \pm 0 \cdot 10^{-6}$ cm/s bei CLD3-1; $11,7 \pm 0,2$; $11,4 \pm 1,4$; $10,9 \pm 0,1$ und $11,0 \pm 0,03 \cdot 10^{-6}$ cm/s bei VEC-2; $4,4 \pm 0,2$; $3,9 \pm 0,3$; $3,9 \pm 0,03$ und $4,0 \pm 0,06 \cdot 10^{-6}$ cm/s bei CLD3-2.

Die beiden Vektor-Kontrollen unterschieden sich nur geringfügig hinsichtlich ihrer Permeabilität für monovalente Anionen, entsprechend der Beobachtung, dass Claudin-2 den Durchtritt von Anionen nicht erhöht. Die Überexpression von Claudin-3 führte in beiden Klonsystemen zu einer Abnahme der Permeabilitäten für monovalente Anionen, die proportional zur Verminderung der Chlorid-Permeabilität war. Die Reihung der Anionen bei den Vektor-Kontrollen entsprach näherungsweise der Sequenz VII für Halogene ($F^- > Cl^- > Br^- > I^-$; Abb. 20). Dies deutet darauf hin, dass die parazellulären Poren das Ion mit dem kleinsten nicht hydrierten Radius bevorzugen, der Durchtritt also größtenteils unhydriert erfolgt. In den Claudin-3-exprimierenden Klonen war keine deutliche Reihung ersichtlich.

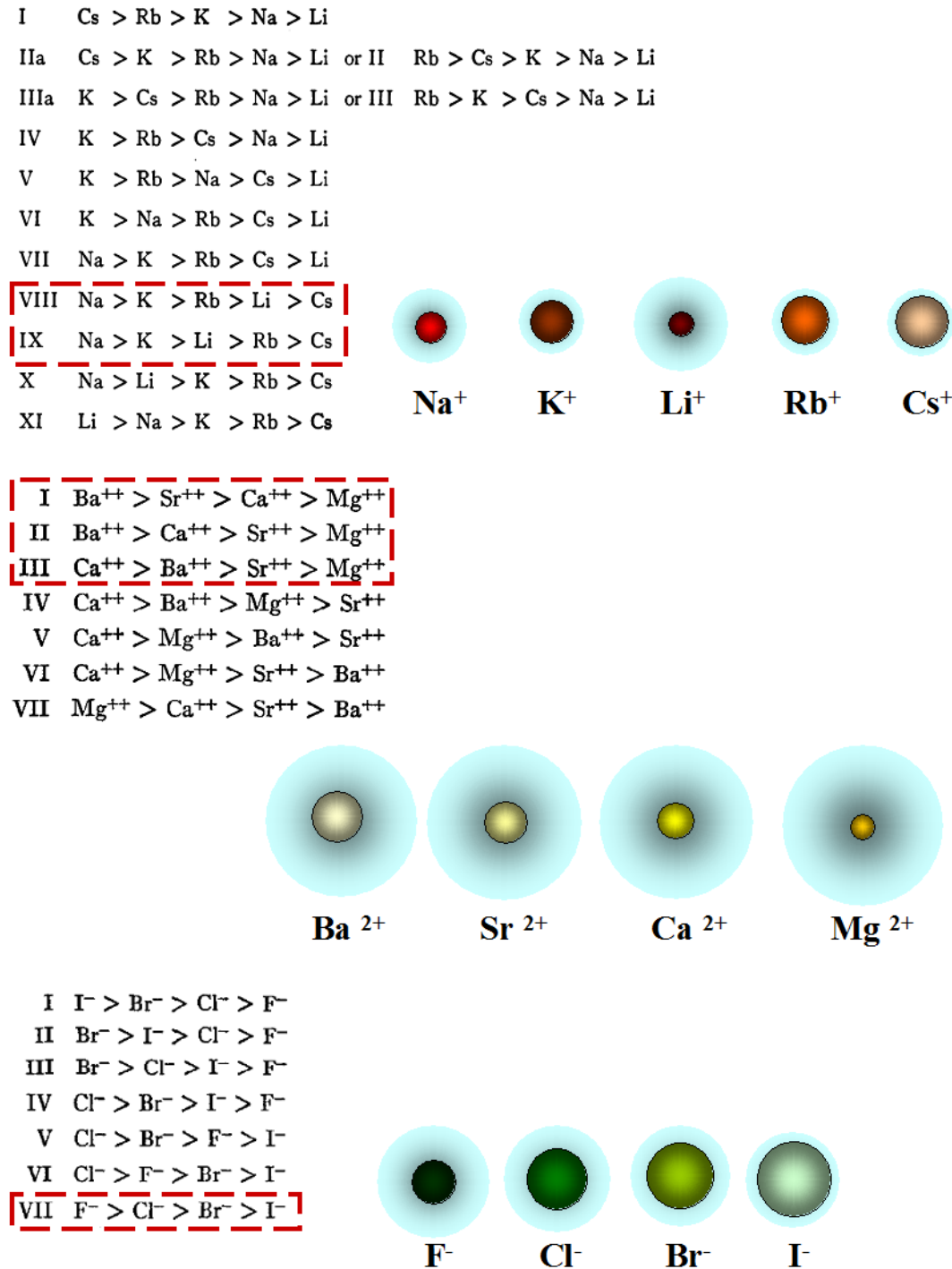


Abb. 20: Mögliche Sequenzen der Permeabilität für ein- und zweiwertige Kationen sowie für einwertige Anionen. Die roten Rechtecke markieren die für die Vektor-Kontrollen erhaltenen Sequenzen. Die Reihung der Permeabilitäten gibt Aufschluss über die Beschaffenheit der Pore (Eisenman et al., 1962; Diamond & Wright, 1969). Die Ionen passieren die Pore in hydriertem oder unhydrierten Zustand, wobei die jeweilige Sequenz I für einen vollständigen Durchtritt mit Hydrathülle steht. Je höher die Sequenz, desto häufiger werden Ionen bei der Passage dehydriert. Ionen mit geringem Radius können aufgrund der hohen Ladungsdichte mehr Wasser-Moleküle anlagern und besitzen eine größere Hydrathülle als große Ionen.

4.1.7. Permeabilität für makromolekulare Marker

Um zu untersuchen, ob Claudin-3 die Tight Junction nicht nur gegen Ionen, sondern auch gegen größere Moleküle abdichten kann, wurden Fluxmessungen mit den parazellulären Größenmarkern Fluoreszein (332 Da) und FITC-Dextran 4000 (FD-4, 4000 Da) durchgeführt.

Im allgemeinen war die Tight Junction der analysierten Klone für größere Moleküle deutlich weniger durchlässig als für Ionen, wobei die Permeabilität für FD-4 noch einmal ca. 20fach geringer war als die für Fluoreszein (Abb. 21).

Die Unterschiede hinsichtlich der Claudin-2-Expression zwischen den Klonsystemen hatten keinen Einfluss auf die Permeabilitäten für beide Moleküle. Die Überexpression von Claudin-3 führte in beiden Systemen zu einer leichten Abnahme der Permeabilität für Fluoreszein (VEC-1: $2,3 \pm 0,5$; CLD3-1: $1,6 \pm 0,3$; VEC-2: $2,4 \pm 0,3$; CLD3-2: $1,5 \pm 0,1 \cdot 10^{-6}$ cm/s). Der Durchtritt des größeren Moleküls FD-4 war in den Überexpressionsklonen im Vergleich zu den Kontrollen um mehr als die Hälfte vermindert, wobei dieser Effekt in Klonssystem 2 etwas stärker war (VEC-1: $0,12 \pm 0,02$; CLD3-1: $0,05 \pm 0,004$; VEC-2: $0,12 \pm 0,04$; CLD3-2: $0,035 \pm 0,008 \cdot 10^{-6}$ cm/s, Abb. 21 b).

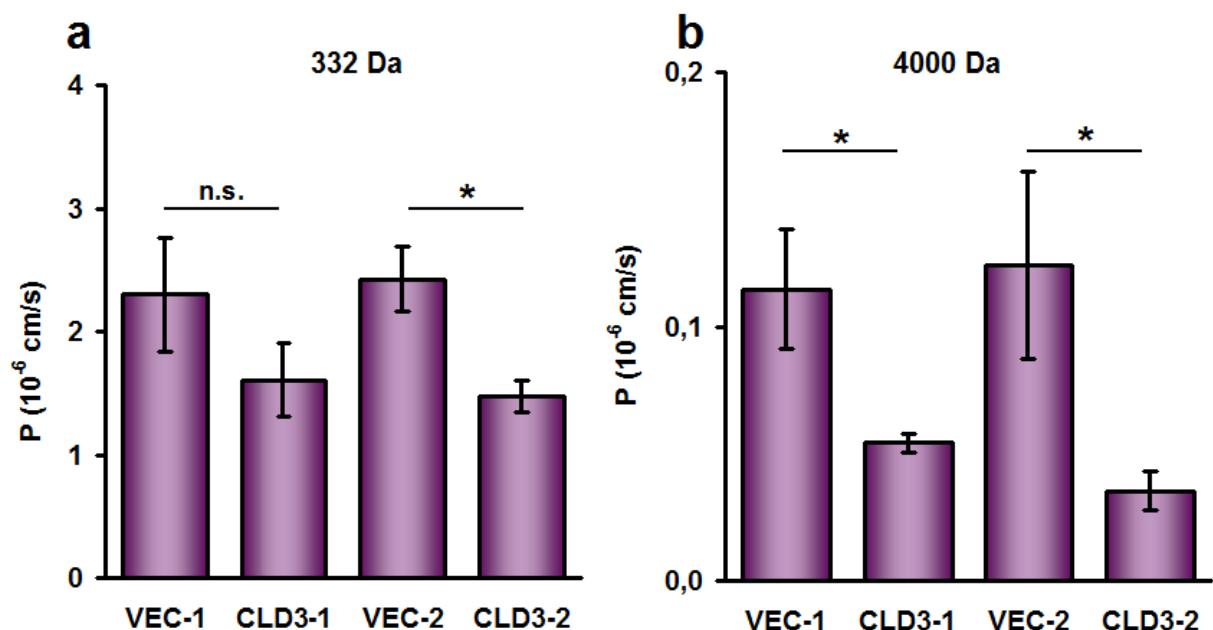


Abb. 21: Permeabilitäten für Fluoreszein (a) und FITC-Dextran 4000 (b) in Vektor-Kontrollen und Claudin-3-transfizierten Zellen. Die Claudin-3-Überexpression führte zur Verminderung der Durchlässigkeit gegenüber Molekülen von 332 bzw. 4000 Da. * $p < 0,05$; n.s.: $p > 0,0$.

4.1.8. Messung der Permeabilität für Wasser

Um die Rolle von Claudin-3 hinsichtlich des parazellulären Wasserdurchtritts zu analysieren, wurden Wasserfluxe in den Vektor-Kontrollen VEC-1 und VEC-2a sowie den Claudin-3-Klonen CLD3-1a und CLD3-2a gemessen. Das Claudin-2-depletierte Klonsystem 2 zeigte etwas geringere Wasserpermeabilitäten als Klonsystem 1 mit normaler Claudin-2-Expression (VEC-1: $8,6 \pm 0,3$; CLD3-1: $8,5 \pm 0,7$; VEC-2: $7,1 \pm 0,5$; CLD3-2: $7,8 \pm 0,3 \cdot 10^{-3}$ cm/s; Abb. 22). Dies deutet darauf hin, dass Claudin-2 die Passage von Wasser in gewissem Umfang ermöglicht. Die Überexpression von Claudin-3 hatte hingegen keinerlei Effekt auf den Durchtritt von Wasser in MDCK II-Zellen.

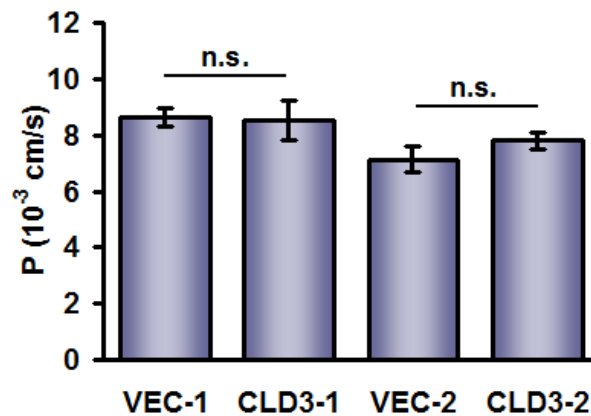


Abb. 22: Permeabilität für Wasser. Die Überexpression von Claudin-3 hatte keinen Einfluss auf die Durchlässigkeit gegenüber Wasser. n.s.: $p > 0,05$

4.1.9. Interaktion von Claudin-2 und Claudin-3

Der Vergleich der beiden Klonsysteme, die sich bezüglich ihrer Claudin-2-Expression unterscheiden, ergab deutliche Unterschiede hinsichtlich der Claudin-3-Überexpression auf die Strangmorphologie sowie die Ladungsselektivität. Ein möglicher Erklärungsansatz dafür wäre, dass die beiden Claudine 2 und 3 miteinander in Interaktion treten und sich auf diese Weise gegenseitig in ihrer Funktion beeinflussen können. Da in der Klongruppe CLD3-1 sowohl Claudin-2 als auch Claudin-3 stark exprimiert sind, wurde Klon CLD3-1a benutzt, um eine mögliche Interaktion mittels Ko-Immunpräzipitation zu untersuchen. Dazu erfolgte die Immunpräzipitation mit Hilfe eines gegen Claudin-3 gerichteten Antikörpers. Anschließendes Immunblotting mit einem gegen Claudin-2 gerichteten Antikörper zeigte eine Interaktion beider Proteine. Um zu überprüfen, ob die Interaktion auch zwischen dem exogenen Claudin-3 und Claudin-2 stattfand, wurde in einem weiteren Experiment anstelle des Anti-Claudin-3-Antikörpers ein gegen das FLAG-Peptid gerichteter Antikörper für die Immunpräzipitation benutzt. Auch in diesem Ansatz konnte eine Ko-Immunpräzipitation mit Claudin-2 nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass exogenes humanes Claudin-3 in der Lage ist, mit endogenem caninen Claudin-2 zu interagieren, wenngleich kein Rückschluss darauf möglich ist, ob diese Interaktion *in cis* oder *in trans* stattfand (Abb. 23). Auch das Auftreten beider Formen der Interaktion wäre möglich.

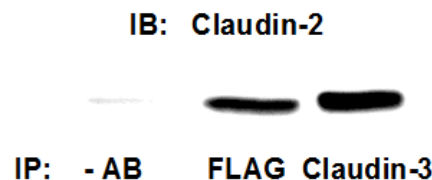


Abb. 23: Ko-Immunpräzipitation von Claudin-3 und Claudin-2. Gesamtzelllysate von Klon CLD3-1 wurden mit Hilfe gegen FLAG bzw. Claudin-3 gerichteter Antikörper immunpräzipitiert (IP). Lysate ohne Antikörper (- AB) dienten als Kontrolle. Ko-Immunpräzipitation mit endogenem Claudin-2 wurde mittels Immunblot (IB) nachgewiesen.

4.2 Expression und Regulation endothelialer Tight Junction-Proteine

Funktion und Regulation der endothelialen Tight Junction sind unverzichtbar für die Aufrechterhaltung einer korrekten Endothelfunktion. Für die Analyse der Expression und Regulation verschiedener Tight Junction-Komponenten wurde das endotheliale Zellkulturmodell HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) verwendet. HUVEC entstammen der humanen Nabelschnurvene und eignen sich für Untersuchungen über den Einfluss physiologisch wichtiger Parameter wie der Strömungsverhältnisse und des Sauerstoffpartialdrucks.

4.2.1. Expression von Tight Junction-Proteinen in HUVEC

Um das Vorkommen verschiedener Tight Junction-Komponenten in HUVEC zu untersuchen, wurde zunächst ein entsprechendes Expressionsprofil mittels Western-Blotting erstellt (Abb. 24 a). Die Tight Junction-Proteine Occludin, Claudin-3, Claudin-5, Claudin-11 und Claudin-23 waren zweifelsfrei exprimiert. Occludin kommt in mehreren Splice-Varianten vor und zeigte mehrere verschieden große Banden, von denen die 65-kDa-Bande für die weitere Analyse herangezogen wurde. Der Claudin-11-Blot zeigte typischerweise eine Doppelbande bei 21 und 16 kDa, wobei die obere Bande dem Claudin-11-Protein (22 kDa) entsprach. Claudin-10 war in zwei von fünf untersuchten Präparationen präsent, in den drei anderen Proben schien es völlig zu fehlen. Auch die Tight Junction-Proteine Claudin-1, Claudin-2, Claudin-4, Claudin-8 und Claudin-12 wurden nicht nachgewiesen. Das Zytoskelett-Protein β -Aktin, das als Positivkontrolle mitgeführt wurde, war in allen Proben deutlich exprimiert.

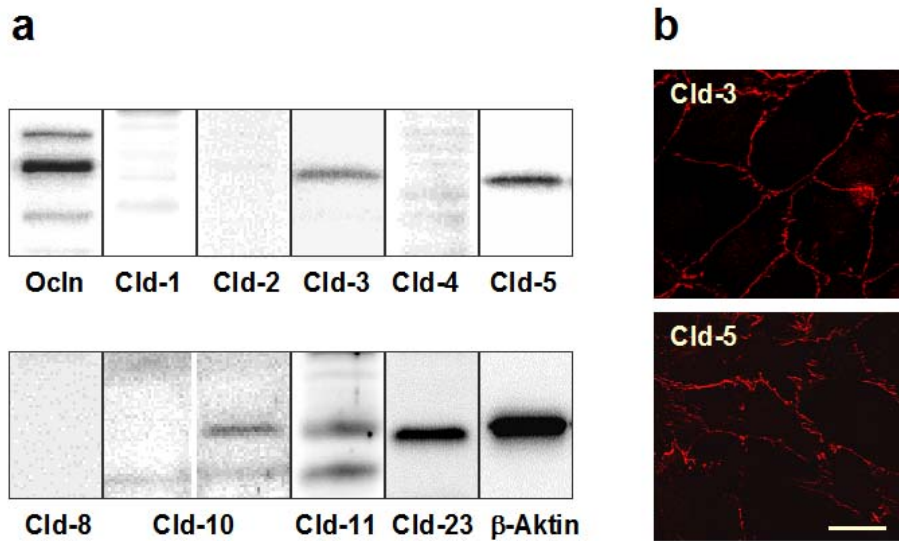


Abb. 24: Expression von Occludin (Ocln), Claudinen (Cld) und β -Aktin in HUVEC. (a) Während Occludin, Claudin-3, -5, -11 und -23 sowie das Zytoskelett-Protein β -Aktin exprimiert wurden, konnte die Expression von Claudin-1, -2, -4 und -8 nicht nachgewiesen werden. Claudin-10 konnte in zwei von fünf Präparationen dokumentiert werden. (b) Immunfluoreszenz-mikroskopische Aufnahme von Claudin-3 (Cld-3) und Claudin-5 (Cld-5) in der Zellmembran von HUVEC. Balken = 20 μ m

4.2.2. Effekt fehlender Wandschubspannung

Da Endothelzellen *in vivo* dem natürlichen Strömungsverhalten des Blutes unterworfen sind, sollten die Auswirkungen einer fehlenden Wandschubspannung, wie sie beispielsweise im Falle einer Gefäßverengung auftreten können, am HUVEC-Modell untersucht werden. Dazu wurden HUVEC für vier oder 24 Stunden mit einer Wandschubspannung von 6 dyn/cm² behandelt (Kontrollen, dyn) oder parallel ohne Wandschubspannung inkubiert (stat; Abb. 25).

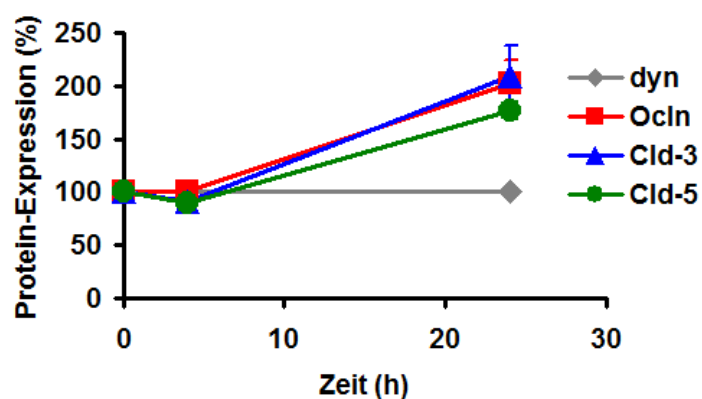


Abb. 25: Effekte von fehlender Wandschubspannung auf die Expression von Tight Junction-Proteinen in Abhängigkeit von der Dauer der Behandlung. Die Abwesenheit von Wandschubspannung führte nach 24 h, nicht aber nach 4 h zu erhöhter Expression der Tight Junction-Proteinen Occludin (Ocln), Claudin-3 (Cld-3) und Claudin-5 (Cld-5) relativ zur mit 6 dyn/cm² behandelten Kontrolle (dyn, 100%).

Während nach vier Stunden keine Unterschiede zwischen den Ansätzen mit und ohne Wandschubspannung zu beobachten waren, zeigte sich nach 24-stündiger Inkubation eine deutliche Erhöhung der Expression von Occludin, Claudin-3 und Claudin-5. Aus diesem Grund wurden für alle weiteren Untersuchungen zur Protein-Expression Zellen für 24 h mit 0 dyn/cm² behandelt und in Relation zur mit 6 dyn/cm² behandelten Kontrolle gesetzt. Abb. 26 zeigt die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse. Die Abwesenheit von Wandschubspannung führte zu einer erhöhten Expression von Occludin (201,9±21,8%; n=8), Claudin-3 (209,8±27,5%; n=9), Claudin-5 (176,4±8,2%; n=11) und Claudin-11 (255,3±34,5%; n=5), während die Expression von Claudin-23 (90,3±12,6%; n=3) und β -Aktin (107,1±4,1%; n=3) unverändert war.

Die Hochregulation der als abdichtend beschriebenen Tight Junction-Komponenten Occludin, Claudin-3, Claudin-5 und Claudin-11 lässt auf eine Stärkung der parazellulären Barriere unter verminderter Wandschubspannung schließen.

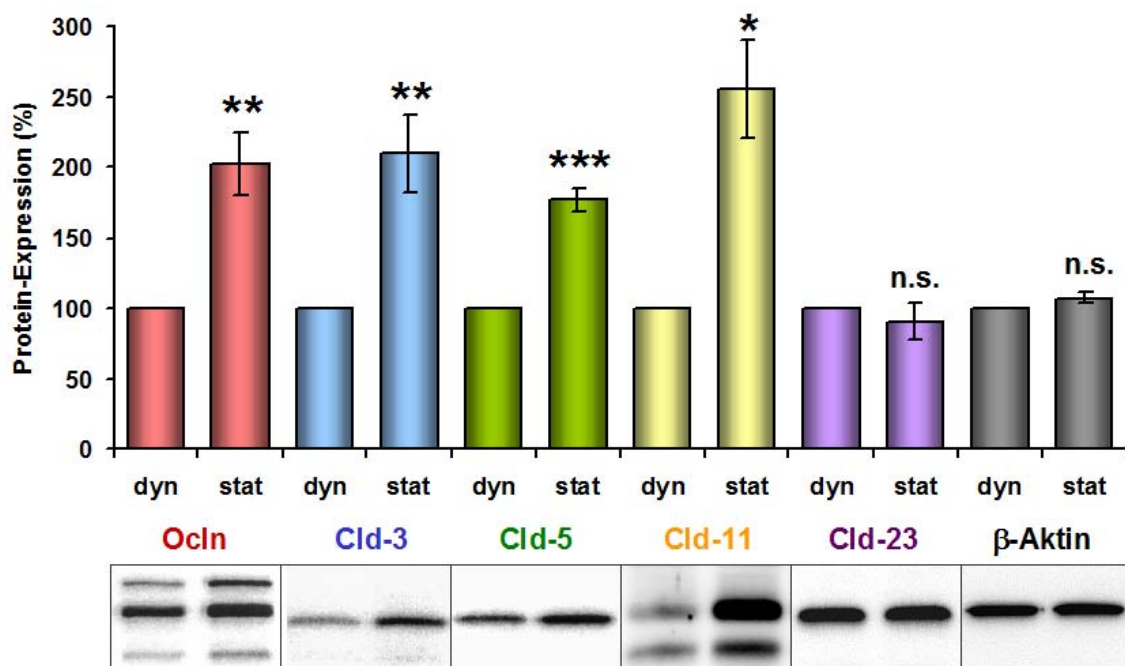


Abb. 26: Regulation der Protein-Expression durch Wandschubspannung. Fehlende Wandschubspannung (stat, 24 h) führte zu erhöhter Expression von Occludin (Occln) und der Claudine (Cld) 3, 5 und 11, nicht aber Claudin-23 oder β -Aktin. Alle Daten sind in Relation zur dynamischen Kontrolle dargestellt, die mit einer Wandschubspannung von 6 dyn/cm² behandelt wurde (dyn, 24 h). $p<0,05$; * $p<0,01$; *** $p<0,001$; n.s.: nicht signifikant.

4.2.3. Analyse des Signalweges

Aus früheren Studien war bekannt, dass die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), die eine wichtige Komponente der endothelialen Signaltransduktion darstellt, in HUVEC durch Applikation von Wandschubspannung aktiviert werden kann (Dimmeler et al., 1998; Chlench et al., 2007). Um die mögliche Beteiligung des PI3K-Signalwegs an den beobachteten Effekten fehlender Wandschubspannung auf die Expression von Tight Junction-Proteinen zu untersuchen, wurden Experimente mit spezifischen Inhibitoren durchgeführt, die für die Dauer des gesamten Experiments zugegeben wurden. Anschließend wurde die Protein-Expression der dynamischen Kontrolle unter Anwendung des spezifischen Inhibitors LY 294002 mit der entsprechenden Expression unter dynamischen und statischen Bedingungen gegenübergestellt. Im Falle einer Beteiligung des inhibierten Signalweges sollte sich die Expression des dynamischen Ansatzes mit Inhibitor „in Richtung“ des statischen Ansatzes bewegen, also statische Bedingungen simulieren.

Die Behandlung mit 10 μ M LY 294002 führte zu einem teilweisen Anstieg der Protein-Expression von Occludin ($151,7\pm 21,9\%$; n=4), Claudin-3 ($140,2\pm 10,2\%$; n=3), und Claudin-5 ($126,6\pm 4,9\%$; n=4) gegenüber der dynamischen Kontrolle, während die Expression von Claudin-11 durch den Inhibitor nicht beeinflusst war ($101,9\pm 24,1\%$; n=3; Abb. 27). Das lässt darauf schließen, dass der PI3K-Signalweg an der Regulation von Occludin, Claudin-3 und Claudin-5 beteiligt, wenn auch nicht allein dafür verantwortlich ist. Die Hochregulation von Claudin-11 scheint hingegen nicht über eine Deaktivierung der PI3K vermittelt zu werden.

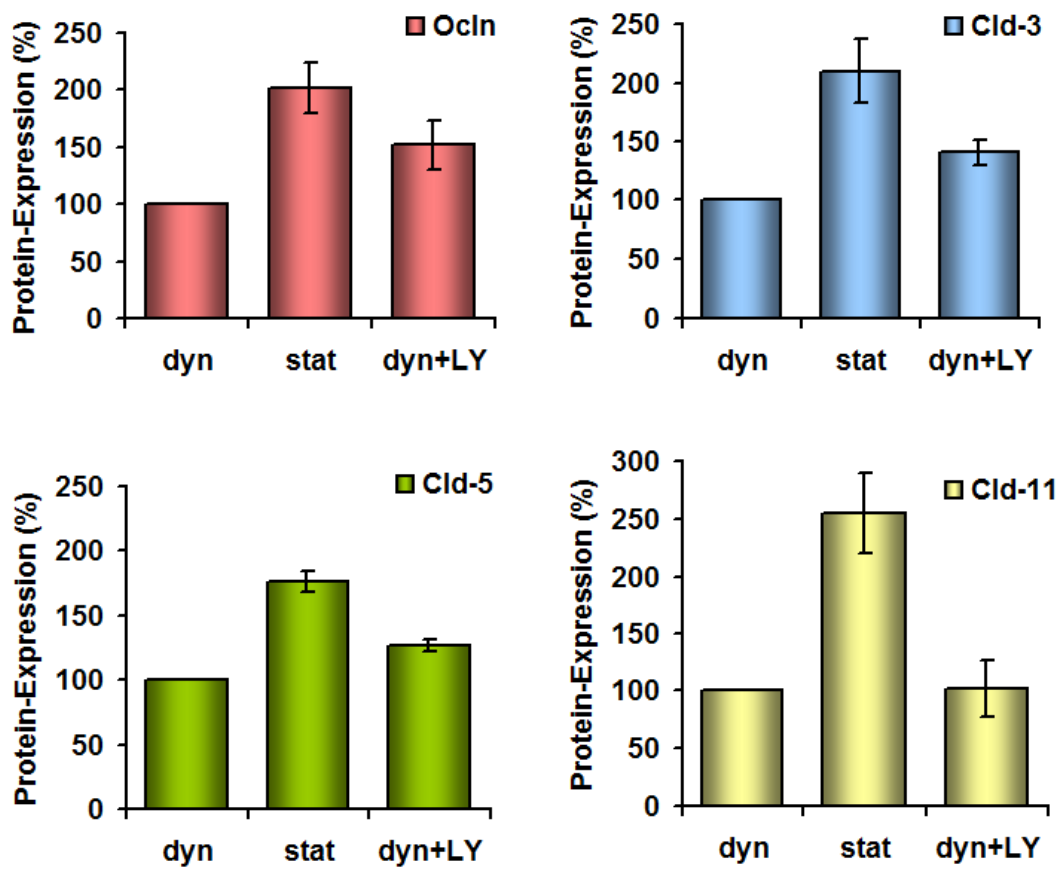


Abb. 27: Simulation des Effektes fehlender Wandschubspannung durch den PI3K-Inhibitor LY 294002. Die Behandlung von dynamischen Proben mit LY 294002 (dyn+LY) führte zu einer erhöhten Expression von Occludin (Ocln), Claudin-3 (Cld-3) und Claudin-5 (Cld-5) gegenüber der dynamischen Kontrolle, gleichbedeutend mit einer Beteiligung des PI3K-Signalwegs an der Regulation dieser Proteine. Die Expression von Claudin-11 wurde hingegen nicht über den PI3K-Weg reguliert.

4.2.4. Transkriptionelle Regulation

Um zu untersuchen, inwieweit die beobachtete Regulation von Tight Junction-Proteinen unter Wandschubspannung in HUVEC auf transkriptioneller Ebene erfolgt, wurden Real-Time-PCRs zur Quantifizierung der mRNA durchgeführt. Dafür wurden HUVEC für verschiedene Zeiträume mit 6 dyn/cm² oder 0 dyn/cm² behandelt und die mRNA-Expression von Occludin, Claudin-3, Claudin-5 und Claudin-11 analysiert. Es zeigte sich, dass bei allen

untersuchten Proteinen eine Regulation auf mRNA-Ebene stattfand, wobei sich die Zeitverläufe der mRNA-Expression jeweils deutlich unterschieden: Während die mRNA-Expression von Occludin bereits nach 4 h um den Faktor 4 erhöht war und dann langsam wieder abnahm, zeigte die Claudin-11-mRNA eine stetige Zunahme und ein Maximum nach 24 h Inkubation, wo sie um den Faktor 4 erhöht war (Abb. 28 a). Die mRNA-Expression von Claudin-3 und Claudin-5 war im Vergleich weniger stark erhöht und fiel bei 12 h bzw. 24 h am stärksten aus (Faktor 2,5 bzw. 1,6). Abb. 28 b zeigt die mRNA-Expression aller untersuchten Proteine nach 24 h mit oder ohne Applikation von Wandschubspannung.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Regulation aller analysierten Tight Junction-Proteine durch fehlende Wandschubspannung zumindest teilweise auf transkriptioneller Ebene stattfindet. Dennoch scheint die Regulation der verschiedenen Proteine auf unterschiedlichen Signalwegen zu erfolgen.

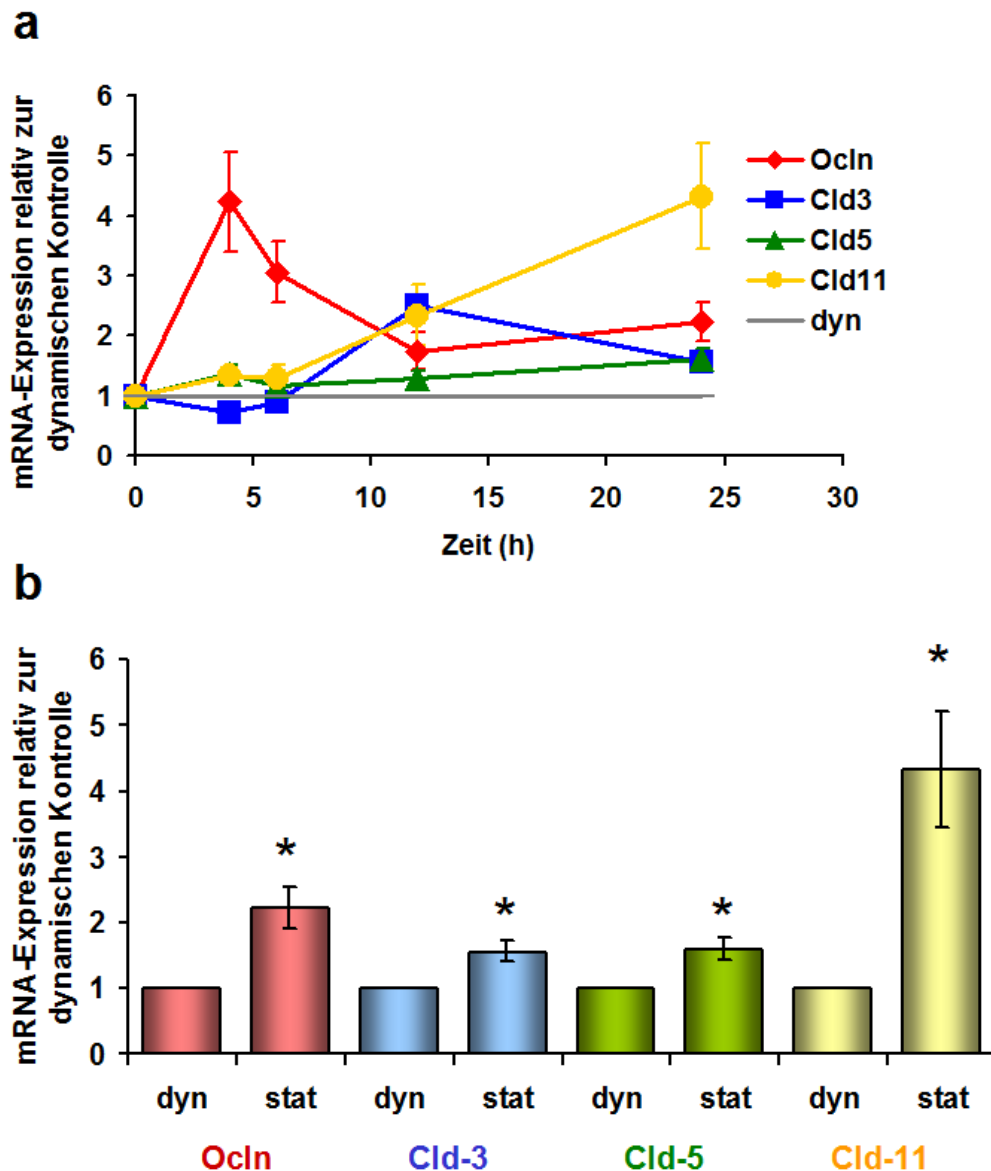


Abb. 28: Effekte fehlender Wandschubspannung auf die mRNA-Expression von Tight Junction-Proteinen in Abhängigkeit von der Dauer der Behandlung (a) und nach 24 h (b). Die Abwesenheit von Wandschubspannung führte zu erhöhter mRNA-Expression von Occludin (Ocln), Claudin-3 (Cld-3) und Claudin-5 (Cld-5) und Claudin-11 (Cld-11) relativ zur mit 6 dyn/cm² behandelten Kontrolle (dyn, =1).

4.2.5. Effekt von Hypoxie

In pathologischen Situationen wie dem Gefäßverschluss tritt die Reduktion der Strömungsgeschwindigkeit häufig gemeinsam mit einer Verminderung des Sauerstoffpartialdrucks (Hypoxie) auf. Um diese Situation *in vitro* zu simulieren, wurde das HUVEC-Modell erweitert und die Behandlung mit fehlender Wandschubspannung zusätzlich mit Hypoxie kombiniert. Die entsprechenden Zellen wurden für die Dauer von 24 Stunden mit 0 dyn/cm² und 3% Sauerstoff (stat+hyp) behandelt und mit parallel unter Normoxie (21% Sauerstoff) inkubierten Ansätzen verglichen.

Abb. 29 fasst die Effekte der kombinierten Behandlung mit fehlender Wandschubspannung und Hypoxie zusammen. Bei Occludin, Claudin-5 und Claudin-11 zeigte sich kein zusätzlicher Effekt gegenüber mangelnder Wandschubspannung allein (219,8±30,6%; 203,2±22,3% und 237,2±29,7% bei Occludin, Claudin-5 und Claudin-11 gegenüber der dynamischen Kontrolle; n=3-5). Im Gegensatz dazu war die Expression von Claudin-3 sowohl gegenüber der dynamischen Kontrolle als auch der Behandlung mit fehlender Wandschubspannung allein auffallend stark gesteigert (614,5±145,3%; n=4).

Der im ersten Teil der Arbeit erbrachte Beleg, dass Claudin-3 als abdichtendes Tight Junction-Protein fungiert, lässt den Schluss zu, dass die parazelluläre Barriere unter hypoxischen Bedingungen durch die Hochregulation von Claudin-3 deutlich gestärkt wird. Weitere Studien sind jedoch nötig, um die zugrunde liegende Signaltransduktion sowie die physiologischen Auswirkungen weiter aufzuklären.

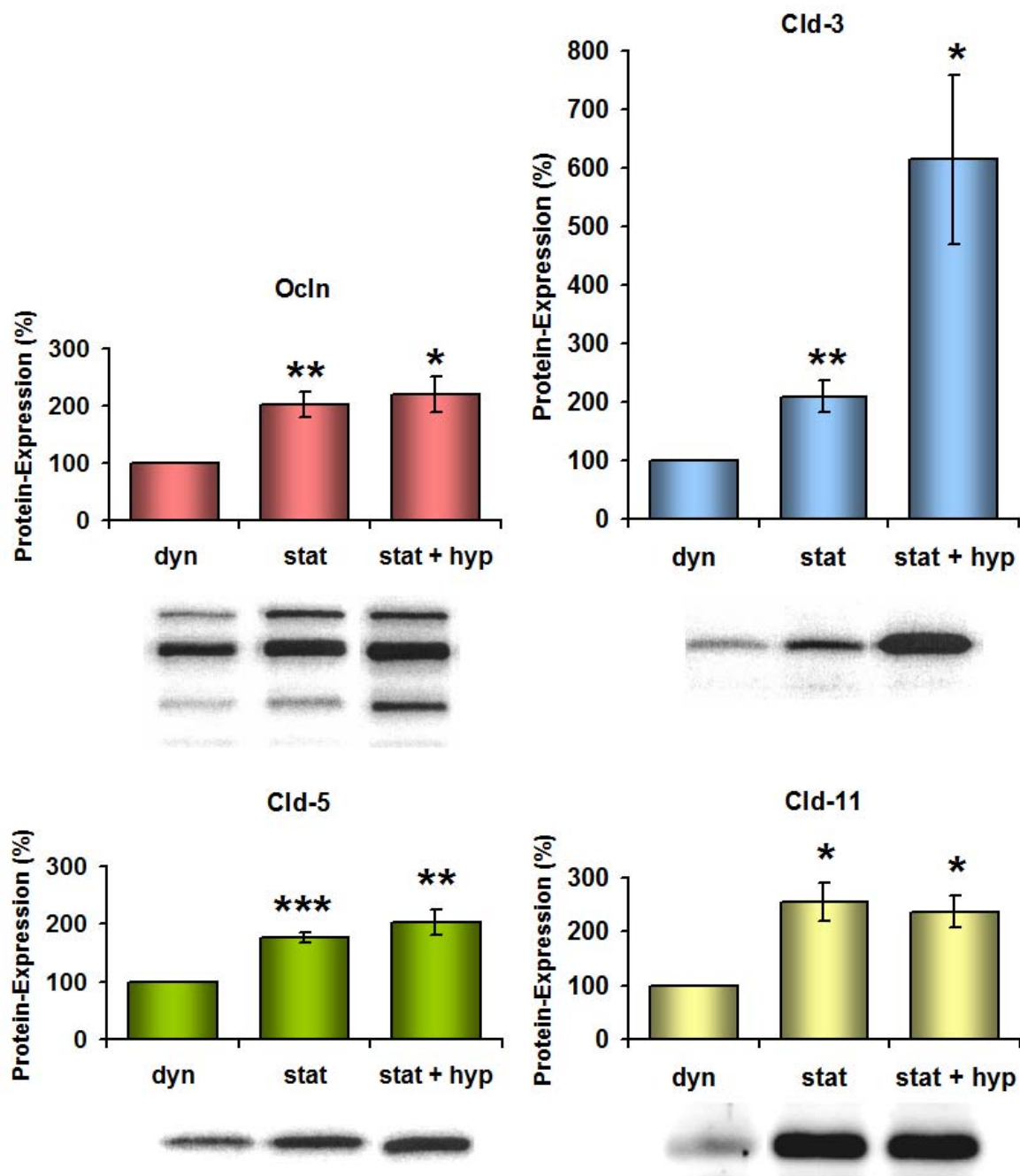


Abb. 29: Veränderte Expression von Tight Junction-Proteinen unter Einfluss fehlender Wandschubspannung (stat) und der Kombination aus fehlender Wandschubspannung und Hypoxie (stat+hyp). Die zusätzliche Applikation von Hypoxie (3%) führte zu erhöhter Expression von Claudin-3, während bei Occludin, Claudin-5 und Claudin-11 kein zusätzlicher Effekt gegenüber mangelnder Wandschubspannung allein zu beobachten war. $p < 0,05$; * $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s.: nicht signifikant; Bonferroni-Holm-korrigiert.

5. Diskussion

5.1 Funktionelle Charakterisierung des Tight Junction-Proteins

Claudin-3

5.1.1. Eignung verschiedener Zellkultursysteme

Um die Funktion eines bestimmten Proteins zu charakterisieren, kommen grundsätzlich zwei antagonistische experimentelle Ansätze in Frage: Einerseits kann das Protein vor dem Hintergrund einer fehlenden oder schwachen endogenen Präsenz zur Überexpression gebracht werden. Im umgekehrten Ansatz kann auch das Herunterregulieren oder Abschalten des Proteins in einem Modell mit deutlicher endogener Expression Aufschluss über seine Funktion geben. Dabei kann zum einen ein Knock-down mittels RNA-Interferenz (RNAi) vorgenommen werden, zum anderen können defiziente Zellmodelle oder Tiere mit Hilfe des spezifischen Gen-Knock-outs generiert und analysiert werden.

Um die Rolle des Claudin-3-Proteins hinsichtlich Struktur und Funktion der Tight Junction aufzuklären, wurde die Verwendbarkeit verschiedener Zellkultursysteme zur Überexpression sowie zur Herunterregulation mittels inhibitorischer RNA überprüft.

Als Modellsysteme für die Überexpression wurden die Zelllinien rbTAL, CaCo-2 und MDCK II, die sich durch unterschiedliche Abstammung sowie heterogene endogene Claudin-Expressionsmuster und parazelluläre Leitfähigkeiten auszeichnen, verwendet. Wie sich herausstellte, waren die benutzten rbTAL- und CaCo-2-Zellen nicht geeignet, um die Effekte einer Claudin-3-Überexpression auf die Permeabilitätseigenschaften der Tight Junction zu analysieren. Die Transfektion führte zwar zu einer deutlichen heterologen Expression von Claudin-3, doch ungleichmäßige Zelldifferenzierung und die Expression anderer Tight Junction-Komponenten (bei CaCo-2) ließen die Durchführung aussagekräftiger elektrophysiologischer Messungen nicht zu. Hingegen erwies sich die etablierte Nierenepithel-Zelllinie MDCK II aus verschiedenen Gründen als geeignet:

MDCK II-Zellen verfügen über einen niedrigen transepithelialen Widerstand und ein schwaches Expressionsniveau von endogenem Claudin-3. Dies ermöglicht einerseits eine effektive Überexpression von Claudin-3 und andererseits eine gute Auflösung der Effekte eines potentiell abdichtenden Tight Junction-Proteins. Die Transfektion von MDCK II führte zu einer starken exogenen Claudin-3-Expression, wobei die Zellen nach einer konsistenten

Differenzierungsphase ein relativ stabiles Widerstandsplateau ausbildeten und für Messungen benutzt werden konnten.

Für den Versuch der Analyse von Claudin-3-defizienten Zellen wurde das MDCK C7-Zellmodell verwendet, da es über eine deutliche endogene Claudin-3-Expression sowie einen hohen parazellulären Widerstand verfügt. Es zeigte sich, dass eine effektive Inhibition mittels RNAi nur möglich war, wenn die inhibitorische RNA unter der Kontrolle des U6-Promotors stand. Die Verwendung des H1-Promotors führte hingegen zu keiner messbaren Hemmung der Claudin-3-Expression. Offenbar handelt es sich bei H1 um einen im Vergleich mit U6 relativ schwachen Promotor, der für den Einsatz zur RNA-Interferenz in MDCK-Zellen nicht geeignet ist. Trotz erfolgreicher Inhibition der Claudin-3-Expression erwiesen sich die hier verwendeten MDCK C7-Zellen als nicht geeignet, um mögliche Effekte einer Claudin-3-Defizienz elektrophysiologisch aufzulösen, weshalb auch dieses Modell nicht für weitere Analysen benutzt wurde.

5.1.2. Überexpression in MDCK II

Die Transfektion von MDCK II mit humaner Claudin-3-cDNA führte zur Selektion einer Reihe von Klonen, die durch starke heterologe Claudin-3-Expression gekennzeichnet waren.

Die Selektion einzelner Zellklone im Anschluss an eine stabile Transfektion kann dazu führen, dass sich die Klone einerseits untereinander und andererseits auch von der Mutterzelllinie, die ein Gemisch verschiedener Subtypen darstellt, unterscheiden können. Um die Effekte der Transfektion gegenüber den Kontrollen richtig beurteilen zu können, müssen die erhaltenen Zelllinien im Hinblick auf einflussreiche Parameter wie der Expression anderer Tight Junction-Proteine analysiert werden. Hinzu kommt, dass die Überexpression eines Tight Junction-Proteins die Expression anderer Tight Junction-Komponenten regulatorisch beeinflussen kann, wie für Claudin-8 und Claudin-2 in MDCK II-Zellen gezeigt wurde (Angelow et al., 2006; Angelow et al., 2007). Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellklone unterschieden sich nicht hinsichtlich der Expression von Occludin oder Claudinen. Eine Ausnahme bildete Claudin-2, das in einem Großteil der Claudin-3-exprimierenden Zellen und in einigen Leervektor-transfizierten Klonen im Vergleich zu nativen MDCK II-Zellen nur schwach exprimiert war. Die Tatsache, dass sich auch Überexpressionsklone fanden, die über eine normale Claudin-2-Expression verfügten, spricht gegen einen regulatorischen Effekt der Claudin-3-Überexpression auf das endogene Claudin-2. Auch das Auftreten von Vektor-Kontrollen mit schwacher Claudin-2-Expression lässt vermuten, dass es sich bei diesem Phänomen eher um einen Effekt der Transfektion handelt. Möglicherweise bot die Behandlung mit Antibiotika im Anschluss an die Transfektion

Claudin-2-defizienten Klonen einen gewissen Selektionsvorteil. Im allgemeinen sind hochohmige Zellen gegenüber Selektionsantibiotika weniger empfindlich als lecke Zellen und überstehen einen Selektionsprozess besser.

Da die parazellulären Transport-Eigenschaften von MDCK II vornehmlich durch die starke Expression des porenbildenden Tight Junction-Proteins Claudin-2 bestimmt werden und die erhaltenen Klone sich hinsichtlich ihrer Claudin-2-Expression deutlich voneinander unterschieden, wurden zwei Klonsysteme etabliert. Während Klonsystem 1 eine für MDCK II-Zellen typisch hohe Claudin-2-Expression aufwies, diente Klonsystem 2 als Modell mit schwacher Claudin-2-Präsenz. In beiden Systemen wurden die Effekte der Claudin-3-Überexpression untersucht, wobei Leervektor-transfizierte Zellen mit jeweils gleich hoher bzw. niedriger Claudin-2-Expression als Kontrollen dienten.

5.1.3. Erhöhte Komplexität der Tight Junction-Ultrastruktur

Die Überexpression von Claudin-3 führte im wesentlichen zu zwei deutlichen Veränderungen der Tight Junction-Ultrastruktur, nämlich einerseits der Veränderung der Strangmorphologie mit der Ausbildung kurviger und schleifenartiger Stränge sowie einer deutlichen Reduktion von Strangbrüchen und Diskontinuitäten andererseits. Der Phänotyp der kurvigen Strangmorphologie ist bereits in früheren Studien bei Überexpression von Claudin-3 beschrieben worden (Furuse et al., 1999; Coyne et al., 2003). Da Claudin-3 in der Lage ist, bei Überexpression in Tight Junction-freien Fibroblasten autonome Stränge mit diesem Erscheinungsbild zu formen, kann darauf geschlossen werden, dass die charakteristisch kurvigen Stränge zu großen Teilen aus Claudin-3 bestehen. Dafür spricht auch, dass die starke Überexpression von Claudin-3 nicht zu einer Verdrängung anderer Komponenten aus der Tight Junction führte, so dass das zusätzlich gebildete Claudin-3 in die Stränge integriert wurde. Obwohl die molekulare Grundlage für diesen Phänotyp momentan nicht bekannt ist, ist es wahrscheinlich, dass die Beugung der Stränge durch die *cis*-Interaktion mehrerer Claudin-3-Moleküle zustande kommt. Eine sehr ähnliche Tight Junction-Morphologie wurde auch in Claudin-4-überexprimierenden MDCK II-Zellen beobachtet (Van Itallie et al., 2001).

Neben der Beugung der Tight Junction-Stränge führte die Claudin-3-Überexpression zu einer deutlichen Reduktion der Strangbrüche und der Diskontinuitäten, wobei sich die Überexpressionsklone mit starker oder schwacher Claudin-2-Expression nicht wesentlich voneinander unterschieden. Der verhältnismäßig geringere Effekt in den Claudin-2-reduzierten Zellen war eindeutig auf die Veränderung der Vektor-Kontrolle zurückzuführen, bei der die Claudin-2-Reduktion bereits zu einer deutlichen Verminderung der Diskontinuitäten und Strangbrüche führte. Die Beobachtung, dass das Auftreten von

Strangdiskontinuitäten mit der Expression von Claudin-2 assoziiert ist, stimmt mit früheren Beobachtungen von Furuse et al. überein (Furuse et al., 1999). Claudin-2 und Claudin-3 scheinen also als Antagonisten hinsichtlich des Auftretens von Diskontinuitäten und Strangbrüchen zu fungieren.

Die durch Claudin-3 verursachte Zunahme der Netzwerk-Komplexität durch Strangbeugung und Abnahme von Diskontinuitäten ist mit großer Wahrscheinlichkeit als wesentliche Ursache für die Verminderung der Permeabilität für Ionen und größere Solute anzusehen.

5.1.4. Verminderung der Ionenpermeabilität

Obwohl Claudin-3 eines der ersten beschriebenen Mitglieder der Claudin-Familie darstellt, konnte seine Funktion bislang nicht eindeutig geklärt werden. Erste Anhaltspunkte deuteten auf eine eher abdichtende Rolle innerhalb der Tight Junction hin. Dazu gehören unter anderem sein starkes Vorkommen in den dichten distalen Segmenten von Darm und Nephron bei relativ schwacher Expression in den entsprechenden lecken proximalen Abschnitten. Erste experimentelle Ansätze sprachen ebenfalls für diese Annahme, wenngleich einige Studien zu kontroversen Ergebnissen führten:

Coyne et al. transfizierten eine Fibroblasten-Zelllinie der Maus (NIH/3T3) und eine humane Atemwegsepithel-Zelllinie (IB3.1) mit humaner Claudin-3-cDNA und beobachteten keine signifikante Änderung des transepithelialen Widerstandes (R^t), wohl aber einen Trend in Richtung einer R^t -Erhöhung (Coyne et al., 2003). In einer anderen Studie von Hou et al. wurde die Claudin-3-Expression der relativ lecken Nierenepithel-Zelllinie MDCK II mittels RNA-Interferenz gestört. Da nur ein relativ kleiner Effekt in Richtung eines leicht verminderten transepithelialen Widerstandes beobachtet wurden, schlossen die Autoren auf eine unbedeutende Rolle von Claudin-3 in der Tight Junction (Hou et al., 2006). In einem ähnlichen Ansatz führten Hashimoto et al. ein Knock-down-Experiment an der humanen Magen-Adenokarzinom-Zelllinie MKN28 durch und beobachteten einen verminderten R^t in mit Claudin-3-siRNA-behandelten Zellen (Hashimoto et al., 2008).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Überexpression von Claudin-3 vor einem lecken Hintergrund führte zur Erhöhung des parazellulären Widerstandes um mehr als das zehnfache, was eine deutliche Steigerung des epithelialen Widerstandes zur Folge hatte. Dieser Effekt beruhte auf einer Verminderung der Permeabilität für alle Ionensorten. Claudin-3 konnte eindeutig als eine die Tight Junction abdichtende Komponente identifiziert werden. Dies stimmt mit den Beobachtungen von Coyne et al. und Hou et al. überein, die eine Tendenz in Richtung einer R^t -Erhöhung bei Claudin-3-Überexpression bzw. eine R^t -Verminderung bei Claudin-3-Defizienz beschrieben. Hou et al. hingegen hatten eine

unbedeutende Rolle von Claudin-3 vermutet, weil ein spezifischer Knock-down in MDCK II zu keiner signifikanten R^t -Änderung geführt hatte. Dieses Ergebnis muss allerdings mit Rücksicht darauf beurteilt werden, dass Claudin-3 in MDCK II nur sehr schwach exprimiert und seine Lokalisation vornehmlich auf die trizelluläre Tight Junction begrenzt ist (Abb. 14). Dementsprechend kann sein Verlust zu verhältnismäßig geringen Effekten führen.

Dieses Beispiel zeigt auch, dass die Ergebnisse von Überexpressionsstudien und Knock-down-Experimenten unbedingt vor dem Hintergrund der endogenen Expression bewertet werden müssen.

5.1.5. Abhängigkeit der Ladungsselektivität von Claudin-2

Obwohl in beiden verwendeten Klonsystemen die Claudin-3-Überexpression zu einer Abdichtung gegenüber allen Ionensorten führte, schien die Ladungsselektivität des exogenen Claudin-3-Proteins von der endogenen Claudin-2-Expression bzw. der Kationenselektivität abzuhängen: Vor dem Hintergrund einer starken Claudin-2-Expression nahm die Permeabilität für Kationen deutlich stärker ab als die für Anionen. Bei geringer Claudin-2-Expression und dementsprechend reduzierter Kationen-Permeabilität bewirkte die Claudin-3-Überexpression ebenfalls eine Abdichtung gegenüber Kationen, wobei dieser Effekt schwächer war als in den Kationen-selektiven Zellen. Die Permeabilität für Anionen wurde hingegen in einem ähnlichen Maß reduziert wie im Claudin-2-starken Klonsystem 1.

Für die Abhängigkeit des Claudin-3 Effektes von der Kationenselektivität der Zellsystems kommen mehrere Erklärungen in Betracht:

1. Claudin-3 dichtet den Interzellularspalt zwar gegen alle Ionen ab, behindert die Passage von Kationen aber stärker als den Durchtritt von Anionen. Eine Claudin-3-basierte Tight Junction müsste in diesem Fall in gewissem Maße durchlässig für Anionen sein, was in einem gewissen Widerspruch zur grundsätzlich abdichtenden Funktion zu stehen scheint. Ein ähnliches Phänomen wurde bereits bei Überexpression von Claudin-4 in MDCK II beschrieben. Dieses Protein hemmte selektiv den Durchtritt von Kationen, während die Anionen-Passage unverändert war (Van Itallie et al., 2001).

2. Claudin-3 dichtet die Tight Junction grundsätzlich gleichermaßen gegen Kat- und Anionen ab. In stark Kationen-selektiven Zellen wirkt sich der abdichtende Effekt aber stärker auf Kationen aus, die die endogene Tight Junction in starker Zahl durch Claudin-2-Poren passieren. Dies legt einen Einfluss des exogenen Claudin-3 auf die spezifische Funktion von Claudin-2 als Kationenpore nahe. Mittels Ko-Immunpräzipitationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass endogenes Claudin-2 und exogenes Claudin-3 in Zellen, die beide

Proteine in ungewöhnlicher Weise gemeinsam exprimieren, miteinander interagieren. Die Kenntnis dieser Interaktion lässt jedoch bislang keinerlei Schluss über ihre Auswirkungen auf die Eigenschaften der Tight Junction zu. Dennoch wäre es denkbar, dass die Interaktion selbst oder die dadurch bedingte Nähe innerhalb der Stränge die spezifische Funktion ein oder beider Proteine beeinflussen. Infolgedessen könnte die Funktion von Claudin-2 als spezifische Kationenpore gestört worden sein.

3. Die Expression von Claudin-2 oder anderen Tight Junction-Proteinen war innerhalb desselben Klonsystems unverändert. Auch die Zahl der Tight Junction-Stränge war in allen analysierten Klonen etwa gleich. Das exogen exprimierte Claudin-3 wurde offenbar zusätzlich in sich ausbildende Tight Junction-Stränge inseriert, was in der Ausformung kurviger und schleifenartiger Stränge resultierte. Dieser Vorgang führte möglicherweise zu einer gewissen „Ausdünnung“ der anderen Tight Junction-Proteine innerhalb des gesamten Netzwerks, wovon in erster Linie Claudin-2 als dominierendes Protein betroffen gewesen wäre. Dieser Effekt könnte möglicherweise zu einer Reduktion der Claudin-2-vermittelten Kationenpermeabilität in Claudin-3-transfizierten Zellen beigetragen haben.

Aus den dargestellten Ergebnissen und Überlegungen lässt sich schlussfolgern, dass Claudin-3 den parazellulären Durchtritt von Ionen wahrscheinlich ohne Ladungsselektivität vermindert. Die spezifische Effekt einer Überexpression hängt allerdings in starkem Maße von dem verwendeten Zellsystem und dessen endogener Claudin-Ausstattung ab. Eine veränderte Regulation unter physiologischen oder pathologischen Bedingungen muss also immer mit Rücksicht auf die Expression der anderen Tight Junction-Proteine beurteilt werden.

5.1.6. Keine Auswirkung auf die Ionenreihung

Die Messung der Ionen-Permeabilitäten am MDCK II-Modell ergab zum einen, dass einwertige Ionen positiver oder negativer Ladung die Tight Junction bevorzugt in unhydriertem Zustand passieren. Diese Beobachtung spricht für eine relativ starke Interaktion mit den parazellulären Poren, in deren Verlauf die Hydrathülle abgestreift wird und das Ion die Tight Junction passiert (Eisenman et al., 1962; Diamond & Wright, 1969). Im Gegensatz dazu scheint der parazelluläre Durchtritt divalenter Kationen in hydriertem Zustand zu erfolgen.

Die Claudin-3-Überexpression verminderte die Permeabilität für alle Ionensorten, ohne die Reihenfolge entsprechend den Sequenzen für monovalente oder divalente Ionen maßgeblich

zu beeinflussen. Dies lässt darauf schließen, dass Claudin-3 der Tight Junction ein zusätzlich abdichtendes Element hinzufügt, ohne die Selektivität der vorhandenen Poren zu verändern.

5.1.7. Abdichtung gegenüber Makromolekülen

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Tight Junction-Komponenten in der Lage sind, die Ionenpermeabilität und den transepithelialen Widerstand zu beeinflussen. Während einige Tight Junction-Proteine darüber hinaus die Permeabilität für größere Solute wie Mannitol oder FITC-Dextran 4000 (FD-4) veränderten, schienen andere den Durchtritt von Ionen, nicht aber von Makromolekülen zu beeinflussen (Van Itallie et al., 2001; Amasheh et al., 2002; Amasheh et al., 2005; Michikawa et al., 2008; Krug et al., 2009; Nitta et al., 2003). Die Überexpression von Claudin-3 in MDCK II führte zu einer mäßig verminderten Permeabilität für Fluoreszein (332 Da) und einem deutlich verringerten Durchtritt des größeren Moleküls FD-4 (4000 Da).

Coyne et al. hatten bereits beobachtet, dass heterogene Claudin-3-Expression in der humanen Atemwegsepithel-Zelllinie IB3.1, nicht aber in murinen Fibroblasten (NIH/3T3) eine verminderte Permeabilität für sehr große Makromoleküle (10, 70 und 2.000 kDa) bewirkte (Coyne et al., 2003). Diese Ergebnisse zeigen, dass Claudin-3 in der Lage ist, die Passage von großen Molekülen zu begrenzen, wobei der Effekt abhängig vom Hintergrund der Wirtszelllinie zu sein scheint. MDCK II-Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie eine gut entwickelte Tight Junction besitzen und fast undurchlässig für Solute mit einem Molekulargewicht über 10 kDa sind.

Die endogene Expression von Claudin-2 schien keinen maßgeblichen Einfluss auf die Permeabilität für größere Solute zu haben. Diese Beobachtung ist konsistent mit den Ergebnissen einer früheren Studie, in denen die Überexpression von Claudin-2 in MDCK C7-Zellen zu keiner Veränderung der Permeabilität für Mannitol geführt hatte (Amasheh et al., 2002).

5.1.8. Unveränderte Wasser-Permeabilität

Seit langem ist bekannt, dass der Transport von Wasser über den transzellulären Weg erfolgen kann. An diesem Prozess ist die Gruppe der Aquaporine maßgeblich beteiligt, die transzelluläre Wasserkanäle ausbilden (Übersicht bei Gomes et al., 2009). Es wird

kontrovers diskutiert, ob Wasser auch über den parazellulären Weg transportiert werden kann und inwieweit Tight Junction-Proteine in diesen Vorgang involviert sind.

Die Überexpression von Claudin-3 in MDCK II hatte keinen messbaren Einfluss auf die Wasserpermeabilität. Insgesamt war die Permeabilität für Wasser im Zellsystem mit reduzierter Claudin-2-Reduktion geringfügig niedriger als in den Zellen mit normal starker Claudin-2-Expression. Diese Beobachtung stimmt mit kürzlich erhobenen Daten überein, nach denen Claudin-2 als parazellulärer Wasserkanal fungiert (unpublizierte Beobachtung). Der verhältnismäßig kleine Effekt lässt sich durch die starke Expression von Aquaporinen in MDCK II erklären, die eine Auflösung eines möglichen Effektes auf die parazelluläre Wasserpermeabilität erschwert.

5.1.9. Rolle innerhalb der Claudin-Familie

Claudin-3 gehört zu den ubiquitär exprimierten Tight Junction-Proteinen und somit vermutlich zur Grundausstattung von vielen Tight Junctions, ähnlich wie Claudin-1 oder Claudin-4. Dennoch unterscheiden sich die Expressionsmuster dieser drei Claudine innerhalb verschiedener Organe und Gewebe (Rahner et al., 2001; Kiuchi-Saishin et al., 2002). Besonders in der endothelialen Tight Junction der Blut-Hirn-Schranke scheint Claudin-3 eine wesentliche Rolle zu spielen (Wolburg et al., 2003). Funktionell zeigt Claudin-3 eine gewisse Ähnlichkeit mit Claudin-4: Beide Proteine führten bei Überexpression in MDCK II-Zellen zu einer Abdichtung der Tight Junction, sie erhöhten den transepithelialen Widerstand und verminderten die Kationenselektivität (Van Itallie et al., 2001). Außerdem wurde für beide Moleküle dokumentiert, dass sie bei Überexpression in sehr lecken Zellen die Permeabilität für sehr große Makromoleküle von 10-2.000 kDa verminderten (Coyne et al., 2003; Michikawa et al., 2008). Auch auf der Ebene der Tight Junction-Ultrastruktur führte die Überexpression beider Proteine zu einem sehr ähnlichen Strangmuster mit kurvigen Schleifen (Abb. 30), die wahrscheinlich durch das jeweils exogene Protein gebildet wurden. Im Gegensatz dazu zeigte die Überexpression von Claudin-1 oder Claudin-5 ein völlig anderes Strangmuster (Van Itallie et al., 2001; Coyne et al., 2003). Eine mögliche Erklärung für die beobachteten Ähnlichkeiten zwischen Claudin-3 und -4 bietet ihre genomische Nachbarschaft auf Chromosom 7 und ihre hohe Sequenzhomologie (Abb. 31), welche auf Ebene der gesamten Aminosäuresequenz 67% beträgt. Die extrazellulären Loops 1 und 2 sind jeweils zu 94% bzw. 68% identisch. Während die Ladungsselektivität von Claudinen durch ihre extrazellulären Loops bestimmt wird, scheint die Strangmorphologie von anderen Domänen abhängig zu sein (Colegio et al., 2003).

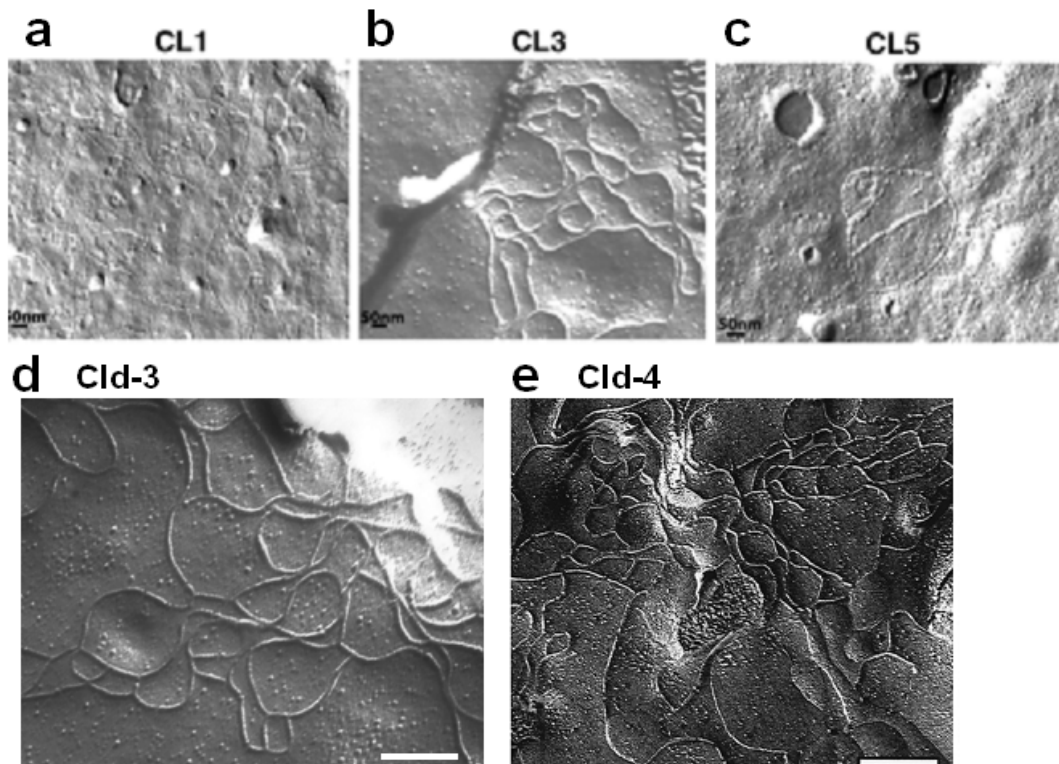


Abb. 30: Gefrierbruch-elektronenmikroskopische Aufnahmen von mit Claudin-1 (a), Claudin-3 (b) oder Claudin-5 (c) transfizierten Maus-Fibroblasten aus Coyne et al. und MDCK II mit Claudin-3- (d) bzw. Claudin-4-Überexpression (e, aus Van Itallie et al.). Claudin-3 und Claudin-4 zeigen ein typisch kurvig-rundes Strangmuster, Claudin-1 und -5 hingegen nicht. Weißer Balken = 200 nm.

In mehreren Studien ist gezeigt worden, dass Claudin-3 und Claudin-4 oft gemeinsam exprimiert und transkriptionell reguliert werden. Beispielsweise scheinen bei der Entwicklung von Ovarialtumoren beide Proteine über Modifikationen der Bindestelle für den Transkriptionsfaktor Sp1 transkriptionell hochreguliert zu sein (Honda et al., 2006; Honda et al., 2007). Während der Differenzierung von Magenkrebs können Claudin-3 und Claudin-4 gemeinsam durch den Transkriptionsfaktor Cdx2 reguliert sein (Satake et al., 2008). Dennoch scheint es Unterschiede hinsichtlich der Regulation auf Proteinebene zu geben. Beispielsweise erfolgte die Phosphorylierung beider Proteine während der Entwicklung von Ovarialtumoren auf unterschiedlichen Wegen (D'Souza et al., 2005). Die Anbindung von Claudinen an die intrazelluläre Signaltransduktion erfolgt in der Regel über ihren C-Terminus. Da die C-Termini von Claudin-3 und -4 über keinerlei Sequenzhomologie verfügen, ist es gut erklärbar, dass ihre Regulation auf Proteinebene verschieden ist.

```

hCla-3 NP001297 M  SMGLEITGTALAVLGWLGTVCCALPMWRVSAFIGSNIITSQN
hCla-4 NP001296 M  ASMGLQVMGIALAVLGWLAVMLCCALPMWRVTAFIGSNI VTSQT

IWEGLWMNCVVQSTGQMCKVYDSLLALPQDLQAARALIVVAILL
IWEGLWMNCVVQSTGQMCKVYDSLLALPQDLQAARALV I I S I V

AAFGLLVALVGAOCTNCVODDTAKAKITIVAGVLFLLAALLTLVP
AALGVLLSVVVGKCTNCLEDESAKAKTMI VAGVV FLLAGLMV I VP

VSWSA NTIIRDFYNPVPPEAQKREMGAGLYVGWAAAALOLLGGAL
VSWTAHNI IQDFYNPLVASGQKREMGASLYVGWAA SGL LLLGGGL

LCCSCPPREKKYTATKVVYSAPRSTGPGASLGTGYDRKDYV
LCCNCP PRTDKPYSAKYSAARSAAASNYV

```

Abb. 31: Vergleich der Aminosäure-Sequenzen von Claudin-3 (oben) und Claudin-4 (unten, beide human). Die gelben und grünen Bereiche stellen jeweils den 1. bzw. 2. extrazellulären Loop dar, der C-Terminus ist grau unterlegt. Nicht homologe Aminosäuren sind in der Claudin-4-Sequenz rot dargestellt.

Eine weiterer Unterschied zwischen Claudin-3 und Claudin-4 ist die Fähigkeit zur *trans*-Interaktion. An allen heterophilen *trans*-Interaktionen, die bisher nachgewiesen werden konnten, war Claudin-3 beteiligt. So sind Interaktionen zwischen Claudin-3 und Claudin-1, -2 und -5 dokumentiert, während Claudin-4 erwiesenermaßen nicht mit Claudin-1, -3 oder -5 *in trans* interagieren kann (Furuse et al., 2001; Coyne et al., 2003; Daugherty et al., 2007).

Die funktionelle Relevanz von Claudinen wird nicht nur durch ihren Beitrag zur parazellulären Permeabilität bestimmt, sondern hängt auch entscheidend von ihrer Regulation und Interaktion mit anderen Tight Junction-Komponenten ab. Dementsprechend kann geschlussfolgert werden, dass jedem Claudin eine einzigartige Rolle im Tight Junction-Komplex zukommt.

5.2 Expression und Regulation endothelialer Tight Junction-Proteine

5.2.1. Expression von Tight Junction-Proteinen in HUVEC

Zusammensetzung und Regulation der endothelialen Tight Junction bilden die Grundlage einer intakten Endothelfunktion. Seit längerer Zeit gilt das Tight Junction-Protein Claudin-5 als Hauptkomponente der endothelialen Tight Junction. Untersuchungen an verschiedenen Endothelien ergaben, dass auch weitere Tight Junction-Komponenten wie Claudin-1 oder Claudin-3 an der Ausbildung der endothelialen Tight Junction beteiligt sein können, wobei die jeweiligen Expressionsmuster sich abhängig von Art und Herkunft des Endothels deutlich unterscheiden. Die Expression von Occludin, Claudin-3, Claudin-5 und Claudin-11 sowie die Abwesenheit von Claudin-1 in HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) war bereits in früheren Studien dokumentiert worden (Scheurer et al., 2004; Fontijn et al., 2006; Wessells et al., 2009). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Claudin-23 in HUVEC deutlich exprimiert ist und einen Bestandteil der endothelialen Tight Junction darstellen kann. Die Claudine 2, 4 und 8 scheinen hingegen nicht an der Ausbildung von endothelialen Tight Junctions beteiligt zu sein, wie auch schon frühere Studien zeigten (Lippoldt et al., 2000).

5.2.2. Abdichtung der Tight Junction bei fehlender Wandschubspannung

Die hämodynamischen Kräfte der Blutströmung sind von entscheidender Bedeutung für die Steuerung verschiedener adaptiver Prozesse. Dabei kommt den Endothelzellen als Grenze zwischen dem Blutgefäß und dem umliegenden Gewebe eine besondere Bedeutung für die Reaktion auf hämodynamische Veränderungen zu. Sie steuern vaskuläre Funktionen wie Blutgerinnung, Angioadaptation und Komplementaktivierung. Über mögliche Auswirkungen einer veränderten Wandschubspannung auf die Funktion des parazellulären Transportwegs an Endothelien liegen bislang jedoch wenig Erkenntnisse vor.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression verschiedener Tight Junction-Komponenten wie Occludin, Claudin-3, Claudin-5 und Claudin-11 unter fehlender Wandschubspannung deutlich hochreguliert war. Die unveränderte Regulation von Claudin-23 und β -Aktin zeigt gleichzeitig, dass es sich hierbei um einen spezifischen Effekt auf einzelne Proteine handelte.

Von DeMaio et al. wurde bereits dokumentiert, dass die Behandlung der bovinen Endothel-Zelllinie BAEC mit Wandschubspannung die Expression von Occludin reduzierte, außerdem seine Phosphorylierung erhöhte und auf diese Weise den parazellulären Transport steigerte (DeMaio et al., 2001). Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltene Befund, dass Occludin unter dem Einfluss fehlender Wandschubspannung in HUVEC hochreguliert wird, entspricht diesem Ergebnis und lässt auf einen allgemeinen Mechanismus schließen, der der Regulation des parazellulären Transports durch Strömungsverhältnisse zugrunde liegt.

Alle hochregulierten Proteine gelten als eher abdichtende Tight Junction-Komponenten. Die Bedeutung von Claudin-3 für die Integrität dichter Endothelien wie der Blut-Hirn-Schranke konnte in einer Studie von Wolburg et al. nachgewiesen werden, in der gezeigt wurde, dass der Verlust der Barriereigenschaften der Blut-Hirn-Schranke im Zusammenhang mit dem *Glioblastoma multiforme* mit dem selektiven Verschwinden von Claudin-3 aus der Tight Junction assoziiert war (Wolburg et al., 2003). Die Rolle von Claudin-5 für die Dichtheit von Endothelien wurde unter anderem in einer Studie von Koto et al. belegt, in der die Inhibition von Claudin-5 durch RNAi in einer Gehirn-Endothel-Zelllinie zu einer Reduktion des transendothelialen Widerstandes führte (Koto et al., 2007). Im Mausmodell verursachte die Claudin-5-Defizienz eine Öffnung der Blut-Hirn-Schranke gegenüber Molekülen unter 800 Da, nicht aber größeren Soluten (Nitta et al., 2003). Ferner konnte kürzlich belegt werden, dass der Knock-Down von Claudin-11 in einer endothelialen Zelllinie des *Corpus cavernosum* ebenfalls zu einer Verminderung des transendothelialen Widerstandes und damit zur Schwächung der parazellulären Barriere führte (Wessells et al., 2009).

Insgesamt kann davon ausgegangen werden, dass die Hochregulation von abdichtenden Tight Junction-Komponenten zu einem verminderten Durchtritt von Ionen und größeren Soluten in Situationen eines verlangsamten Blutflusses führt. Dadurch könnte verhindert werden, dass die durch verzögerten Blutfluss verursachte lokale Akkumulation von Substanzen zu einem nicht erwünschten Durchtritt in das umliegende Gewebe führt.

5.2.3. Unterschiedliche Regulation der Tight Junction-Komponenten

Die Resultate der quantitativen PCR sowie der Experimente mit dem Inhibitor der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) zeigten deutlich, dass der unter fehlender Wandschubspannung veränderten Regulation von Occludin, Claudin-3, Claudin-5 und Claudin-11 unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen. Die Expression von Occludin schien relativ früh auf transkriptioneller Ebene angeschaltet zu werden, wobei an der Hochregulation auf Proteinebene der PI3K-Signalweg beteiligt war. Die Claudine 3 und 5 unterlagen hingegen einer schwächeren und späteren transkriptionellen Regulation, auch

hier war die PI3K an der erhöhten Protein-Expression beteiligt. Die Hochregulation der Claudin-11-mRNA erfolgte ebenfalls relativ spät. Im Gegensatz zu den anderen Tight Junction-Proteinen war der Regulationsmechanismus jedoch völlig unabhängig vom PI3K-Signalweg. Der Befund, dass der durch Wandschubspannung induzierte PI3K-Signalweg nur teilweise für die Regulation von Occludin, Claudin-3 und -5 und gar nicht für die veränderte Expression von Claudin-11 verantwortlich war, konnte durch Vorversuche abgesichert werden, in denen die PI3K bei der verwendeten Dosis von 10 μ M vollständig hemmbar war.

Obwohl Einzelheiten der Signaltransduktionswege der vier analysierten Tight Junction-Proteine offen bleiben, legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass die durch veränderte Schubspannung verursachte Regulation zellulärer Prozesse in mehreren Phasen verläuft. Eine der frühzeitig regulierten Tight Junction-Komponenten stellt offenbar Occludin dar, dem vor allem eine regulatorische Funktion beigemessen wird (Saitou et al., 2000).

5.2.4. Hochregulation von Claudin-3 bei Hypoxie

In vivo ist das Auftreten eines verlangsamten Blutflusses häufig mit einer Verminderung des Sauerstoffpartialdruckes (Hypoxie) assoziiert. Aus diesem Grund wurde untersucht, inwieweit sich die zusätzliche Applikation von Hypoxie auf die Expression der unter fehlender Wandschubspannung hochregulierten Proteine auswirkt. Während bei Occludin, Claudin-5 und -11 keine weitere Steigerung der Protein-Expression gegenüber den Ansätzen mit fehlender Wandschubspannung allein zu beobachten war, zeigte Claudin-3 eine sehr starke Hochregulation unter Hypoxie. Dieses Ergebnis deckt sich mit Daten einer früheren Studie, in der die Hochregulation Claudin-3-mRNA unter Hypoxie in HUVEC mittels Affymetrix microarray-Analyse gezeigt wurde (Scheurer et al., 2004). Claudin-3 konnte im Rahmen dieser Arbeit eindeutig als ein die Tight Junction gegen den Durchtritt von Ionen und Makromolekülen abdichtendes Protein beschrieben werden.

Insgesamt lässt sich schließen, dass das kombinierte Auftreten von verlangsamtem Blutfluss und Hypoxie im Zusammenhang mit pathologischen Situationen wie dem Gefäßverschluss zu einer zusätzlichen Abdichtung der endothelialen Tight Junction gegenüber Ionen und Soluten führt, die durch die starke Hochregulation von Claudin-3 vermittelt wird. Besonders in der Blut-Hirn-Schranke, für deren Intaktheit Claudin-3 eine wichtige Rolle zu spielen scheint, könnte ein entsprechender Mechanismus von hoher Bedeutung sein.

5.2.5. Bedeutung in Physiologie und Pathophysiologie

Die am HUVEC-Zellkulturmodell erhaltenen Ergebnisse zeigen deutlich, dass die endotheliale Tight Junction einer komplexen Regulation unterliegt, die es ermöglicht, den Durchtritt von Soluten aus dem Blut in das umliegende Gewebe unter verschiedenen physiologischen oder pathophysiologischen Bedingungen spezifisch zu steuern. Die Hochregulation von vier als abdichtend charakterisierten Tight Junction-Komponenten bei ausbleibender Wandschubspannung deutet auf eine verminderte Permeabilität der gesamten Tight Junction für Ionen und Substanzen in Situationen eines verlangsamten Blutflusses hin, wie sie im Zusammenhang mit der Angiogenese, aber auch in pathologischen Situationen wie Gefäßverengung oder Thrombose auftreten können.

Herrschen zusätzlich hypoxische Bedingungen, wie sie häufig gemeinsam mit verlangsamten Blutfluss vorkommen, erfolgt darüber hinaus eine dramatische Hochregulation von Claudin-3, das im Rahmen dieser Arbeit als abdichtendes Tight Junction-Protein charakterisiert worden ist und das für die Integrität dichter Endothelien wie der Blut-Hirn-Schranke von großer Bedeutung zu sein scheint (Wolburg et al., 2003). Das selektive Hochregulieren von Claudin-3 unter hypoxischen Bedingungen führt zu einer weiteren Stärkung der parazellulären Barriere, wobei die verstärkte Abdichtung gegenüber makromolekularen Substanzen hier wahrscheinlich von besonderer Bedeutung ist. Bei lokaler Anreicherung im Blut gelöster Substanzen würde ein unerwünschter parazellulärer Durchtritt vermindert oder inhibiert werden.

Insgesamt ist die Tight Junction Teil des sehr komplexen Prozesses der endothelialen Adaptation an Strömungsverhältnisse und Sauerstoffpartialdruck. Ihre Regulation stellt einen Schutzmechanismus im Sinne einer notfallmäßigen endothelialen Abdichtung bei kritisch verminderten Strömungsbedingungen und absinkendem Sauerstoffpartialdruck dar.

6. Zusammenfassung

Die Tight Junction reguliert den parazellulären Transport von Ionen, Wasser und Soluten an Epithelien und Endothelien. Ihre molekulare Struktur und die Regulation ihrer Komponenten sind von entscheidender Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Funktion von Organen und Geweben. Die Familie der Claudine stellt die größte und bedeutendste Gruppe der Tight Junction-Proteine dar.

Erstes Ziel der Arbeit war die Aufklärung der Barriere- oder Porenfunktion des Tight Junction-Proteins Claudin-3. Im zweiten Teil wurde an Endothelzellen der Effekt von ausbleibender Wandschubspannung und Hypoxie untersucht, wobei sich herausstellte, dass auch hier Claudin-3 eine zentrale Rolle spielt.

Claudin-3 ist Bestandteil vieler Epithelien und Endothelien. Während die meisten anderen der wie Claudin-3 frühzeitig entdeckten Claudine wie Claudin-1, -2, -4, -5, -8 und -10 bereits recht gut charakterisiert sind, konnte die spezifische Funktion von Claudin-3 bislang nicht eindeutig geklärt werden.

Für die funktionelle Charakterisierung des humanen Claudin-3-Proteins wurden stabile Überexpressionsklone der lecken Nierenepithel-Zelllinie MDCK II mit niedrigem transepithelialen Widerstand (R^t) und schwacher endogener Claudin-3-Expression generiert. Die erzeugten Claudin-3-Klone und Leervektor-Kontrollen wurden zwei Gruppen zugeordnet: Klonsystem 1 mit starker endogener Präsenz des Porenbildners Claudin-2 und Klonsystem 2 mit deutlich reduzierter Claudin-2-Expression. Die Effekte der Claudin-3-Überexpression auf die Morphologie sowie die Permeabilität der Tight Junction wurden in beiden Klonsystemen unabhängig voneinander analysiert.

Die Überexpression von Claudin-3 führte zu einer deutlich gesteigerten Komplexität des Tight Junction-Strangmusters und der Ausbildung kontinuierlicher Stränge mit einem charakteristischen kurvig-runden Erscheinungsbild.

Funktionell verursachte die Claudin-3-Überexpression eine starke Zunahme des parazellulären Widerstandes und eine verminderte Permeabilität für Kationen und Anionen. Dabei hing die Ladungspräferenz von der endogenen Kationenselektivität ab: Bei starker Claudin-2-Expression und hoher Kationenselektivität verminderte Claudin-3 bevorzugt die Permeabilität für Kationen und in geringerem Umfang die Anionen-Permeabilität. Bei geringer Claudin-2-Expression und dementsprechend reduzierter Kationenselektivität bewirkte Claudin-3 hingegen eine Abdichtung gegenüber Kat- und Anionen ohne Ladungsselektivität.

Weiterhin verminderte Claudin-3 die Permeabilität für Moleküle der Größe 332 Da und 4000 Da, nicht aber den parazellulären Durchtritt von Wasser.

Somit konnte erstmals eindeutig gezeigt werden, dass Claudin-3 zu den abdichtenden Komponenten der Tight Junction gehört, das die Komplexität ihres Strangmusters erhöht und vermutlich auf dieser Grundlage den parazellulären Durchtritt von Ionen und größeren Soluten limitiert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Expression und Regulation von Claudin-3 und anderen Tight Junction-Proteinen anhand des endothelialen Zellkulturmodells HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) analysiert. Dabei wurde untersucht, inwieweit physiologisch bedeutsame Parameter wie Strömungsverhältnisse oder Sauerstoffpartialdruck die Regulation der in HUVEC exprimierten Tight Junction-Komponenten Occludin, Claudin-3, Claudin-5, Claudin-11 und Claudin-23 beeinflussen.

Dafür wurden HUVEC entweder einer Wandschubspannung wie unter natürlichen Strömungsbedingungen (6 dyn/cm²) ausgesetzt oder aber ohne Wandschubspannung inkubiert. Als zusätzliche Variation wurde die fehlende Wandschubspannung mit einem verminderten Sauerstoffpartialdruck (Hypoxie, 3% O₂) kombiniert und so die Verhältnisse, die bei einer kritischen Verminderung des Blutflusses auftreten, simuliert.

Die Behandlung mit fehlender Wandschubspannung führte zur Hochregulation der als abdichtend charakterisierten Tight Junction-Proteine Occludin, Claudin-3, Claudin-5 und Claudin-11, nicht aber Claudin-23. Die Regulation der einzelnen Tight Junction-Komponenten erfolgte wahrscheinlich auf unterschiedlichen Signalwegen, wenngleich allen verstärkt exprimierten Proteinen eine Hochregulation auf mRNA-Ebene gemein war. Bei Occludin, Claudin-3 und Claudin-5 schien der PI3K-Signalweg involviert, wenn auch nicht vollständig verantwortlich zu sein. Die Hochregulation von Claudin-11 erfolgte hingegen nicht über die PI3K.

Die kombinierte Behandlung mit fehlender Wandschubspannung und Hypoxie verursachte eine um das sechsfache erhöhte Expression von Claudin-3.

Es konnte gezeigt werden, dass an Endothelien unter Bedingungen fehlender Wandschubspannung und Hypoxie, wie sie in verschiedenen physiologischen und pathologischen Situationen wie der Angiogenese, der Gefäßverengung oder Thrombose auftreten können, eine Hochregulation abdichtender Tight Junction-Komponenten und damit eine Stärkung der parazellulären Barriere auftritt. Die hier beschriebene Abdichtung stellt einen sinnvollen Schutzmechanismus dar, um einen unerwünschten Durchtritt von Substanzen aus dem Blut in das umliegende Gewebe bei durch verzögerten Blutfluss verlängerter Kontaktzeit mit der Endothelwand zu limitieren.

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BAEC	<i>bovine aortic endothelial cells</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
c	Konzentration
CCD (Kamera)	<i>charge coupled device</i>
cDNA	<i>copy</i> Desoxyribonukleinsäure
Cld	Claudin
CMV	Cytomegalievirus
CPE	<i>clostridium perfringens</i> -Enterotoxin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ECL	extrazellulärer Loop
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
et al.	<i>et alii</i> , und andere
FD-4	FITC-Dextran 4000
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
G	Leitfähigkeit
g	Gramm
g (Zentrifuge)	Gravitationskraft
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HCCEC	Human Corpus Cavernosum Endothelial Cells
HEPES	2(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
Hz	Hertz

I	elektrische Stromstärke
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
I _{sc}	Kurzschlussstrom
J	Flux
JAM	<i>Junctional Adhesion Molecule</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kHz	Kilohertz
LB	<i>lysogeny broth</i>
LSM	Laserscanning-Mikroskopie
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MDCK	<i>Madin-Darby Canine Kidney</i>
MEM	Minimum Essential Medium
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol pro Liter
mRNA	<i>messenger-Ribobukleinsäure</i>
Mv	Mikrovilli
n.s.	nicht signifikant
ng	Nanogramm
NISCH-Syndrom	<i>neonatal ichthyosis-sclerosing cholangitis syndrome</i>
nm	Nanometer
Ocln	Occludin
OSP	Oligodendrozyten-spezifisches Protein
P	Permeabilität
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBST	<i>phosphate buffered saline + tween</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDZ	PSD-95/Discs Large/ZO-1-Domäne
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
pm	Picometer
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	elektrischer Widerstand
rad	Radiant
rbTAL	<i>Rabbit Thick Ascending Limb</i>

R^{epi}	epithelialer Widerstand
RIPA	Radio Immuno Precipitation Assay
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
R^{para}	parazellulärer Widerstand
rpm	Umdrehungen pro Minute
R^{sub}	subepithelialer Widerstand
R^{t}	transepithelialer Widerstand
RT	Reverse Transkription
R^{trans}	transzellulärer Widerstand
RVP	<i>rat ventral prostate</i>
s	Sekunden
SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
shRNA	<i>small hairpin</i> Ribonukleinsäure
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Acetate/EDTA
TBST	TRIS buffered saline
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TER	Transepithelialer Widerstand
TJ	Tight Junction
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSR	<i>template suppression reagent</i>
U	elektrische Spannung
UV	ultraviolett
V	Volt
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galaktosid
ZO	Zonula occludens

Literaturverzeichnis

- Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, Schöneberg T, Mankertz J, Schulzke JD, Fromm M (2002) Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci* 115:4969-4976
- Amasheh S, Schmidt T, Mahn M, Florian P, Mankertz J, Tavalali S, Gitter AH, Schulzke JD, Fromm M (2005) Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells. *Cell Tissue Res* 321:89-96
- Angelow S, Kim KJ, Yu AS (2006) Claudin-8 modulates paracellular permeability to acidic and basic ions in MDCK II cells. *J Physiol* 571:15-26
- Angelow S, Schneeberger EE, Yu AS (2007) Claudin-8 expression in renal epithelial cells augments the paracellular barrier by replacing endogenous claudin-2. *Membr Biol* 215:147-159
- Arrate MP, Rodriguez JM, Tran TM, Brock TA, Cunningham SA (2001) Cloning of human junctional adhesion molecule (JAM3) and its identification as the JAM2 counter-receptor. *J Biol Chem* 276:45826-45832
- Aurrand-Lions MA, Duncan L, Ballestrem C, Imhof BA (2001) JAM-2, a novel immunoglobulin superfamily molecule, expressed by endothelial and lymphatic cells. *J Biol Chem* 276:2733-2741
- Balda MS, Whitney MA, Flores C, González S, Cereijido M, Matter K (1996) Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J Cell Biol* 134:1031-1049
- Briehl MM, Miesfeld RL (1991) Isolation and characterization of transcripts induced by androgen withdrawal and apoptotic cell death in the rat ventral prostate. *Mol Endocrinol* 5:1381-1388
- Challier JC, Dubernard G, Galtier M, Bintein T, Vervelle C, Raison D, Espie MJ, Uzan S (2005) Junctions and adhesion molecules in first trimester and term human placentas. *Cell Molec Biol* 51:OL713-OL722

- Chlench S, Disassa NM, Hohberg M, Hoffmann C, Pohlkamp T, Beyer G, Bongrazio M, Da Silva-Azevedo L, Baum O, Pries AR, Zakrzewicz A (2007) Regulation of Foxo-1 and the angiopoietin-2/Tie2 system by shear stress. *FEBS Lett* 581:673-680
- Colegio OR, Van Itallie CM, Rahner C, Anderson JM (2003) Claudin extracellular domains determine extracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture. *Am J Physiol Cell Physiol* 284:1346-1354
- Corada M, Liao F, Lindgren M, Lampugnani MG, Breviario F, Frank R, Muller WA, Hicklin DJ, Bohlen P, Dejana E (2001) Monoclonal antibodies directed to different regions of vascular endothelial cadherin extracellular domain affect adhesion and clustering of the protein and modulated endothelial permeability. *Blood* 97:1679-1684
- Corada M, Mariotti M, Thurston G, Smith K, Kunkel R, Brockhaus M, Lampugnani MG, Martin-Padura I, Stoppacciaro A, Ruco L, McDonald DM, Ward PA, Dejana E (1999) Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 96:9815-9820
- Coyne CB, Gambling TM, Boucher RC, Carson JL, Johnson LG (2003) Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285:1166-1178
- Cunningham SA, Arrate MP, Rodriguez JM, Bjercke RJ, Vanderslice P, Morris AP, Brock TA (2000) A novel protein with homology to the junctional adhesion molecule. Characterization of leukocyte interactions. *J Biol Chem* 275:34750-34756
- D'Souza T, Agarwal R, Morin PJ (2005) Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP-dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. *Exp Cell Res* 280:3364-3375
- Daugherty BL, Ward C, Smith T, Ritzenthaler JD, Koval M (2007) Regulation of heterotypic claudin compatibility. *J Biol Chem* 282:30005-30013
- DeMaio L, Chang YS, Gardner TW, Tarbell JM, Antonetti DA (2001) Shear stress regulates occludin content and phosphorylation. *A J Physiol Heart Circ Physiol* 281:H105-H113
- Diamond JM, Wright EM (1996) Biological membranes: the physical basis of ion and nonelectrolyte selectivity. *Annu Rev Physiol* 58:581-646
- Dimmeler S, Assmus B, Hermann C, Haendeler J, Zeiher AM (1998) Fluid shear stress stimulates phosphorylation of Akt in human endothelial cells. involvement in suppression

- of apoptosis. *Circ Res* 83:334-341
- Eisenman G (1962) Cation selective glass electrodes and their mode of operation. *Biophys J* 2:259-323
- Enerson BE, Drewes LR (2006) The rat blood-brain barrier transcriptome. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:959-973
- Feldmeyer L, Huber M, Fellmann F, Beckmann JS, Frenk E, Hohl D (2006) Confirmation of the origin of NISCH syndrome. *Hum Mutat* 27:408-410
- Fontijn RD, Rohlena J, Van Marle J, Pannekoek H, Horrevoets AJG (2006) Limited contribution of claudin-5-dependent tight junction strands to endothelial barrier function. *Eur J Cell Biol* 85:1131-1144
- Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S (2001) Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J Cell Biol* 153:263-272
- Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S (2002) Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 156:1099-1111
- Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S (1993) Occludin: A novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123:1777-1788
- Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S (1998) A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol* 143:391-401
- Furuse M, Sasaki H, Tsukita S (1999) Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J Cell Biol* 147:891-903
- Gekle M, Wunsch S, Oberleitner H, Silbernagl S (1994) Characterization of two MDCK-cell subtypes as a model system to study principal cell and intercalated cell properties. *Pflügers Arch* 428:157-162
- Gomes D, Agasse A, Thiébaud P, Delrot S, Gerós H, Chaumont F (2009) Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. *Biochim Biophys Acta* 1788:1213-1228

- Gow A, Davies C, Southwood CM, Frolenkov G, Chrustowski M, Ng L, Yamauchi D, Marcus DC, Kachar B (2004) Deafness in claudin 11-null mice reveals the critical contribution of basal cell tight junctions to stria vascularis function. *J Neurosci* 24:7051-7062
- Günzel D, Stuver M, Kausalya PJ, Haisch L, Krug SM, Rosenthal R, Meij IC, Hunziker W, Fromm M, Müller D (2009) Claudin-10 exists in six alternatively spliced isoforms that exhibit distinct localization and function. *J Cell Sci* 122:1507-1517
- Hadj-Rabia S, Baala L, Vabres P, Hamel-Teillac D, Jacquemin E, Fabre M, Lyonnet S, De Prost Y, Munnich A, Hadchouel M, Smahi A (2004) Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease. *Gastroenterology* 127:1386-1390
- Hashimoto K, Oshima T, Tomita T, Kim Y, Matsumoto T, Joh T, Miwa H (2008) Oxidative stress induces gastric epithelial permeability through claudin-3. *Biochem Biophys Res Commun* 376:154-157
- Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, Mankertz J, Gitter AH, Bürgel N, Fromm M, Zeitz M, Fuss I, Strober W, Schulzke JD (2005) Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 129:550-564
- Hewitt JK, Agarwal L, Morin PJ (2006) The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC Cancer* 6:186
- Hirabayashi S, Tajima M, Yao I, Nishimura W, Mori H, Hata Y (2003) JAM4, a junctional adhesion molecule interacting with a tight junction protein, MAGI-1. *Mol Cell Biol* 23:4267-4282
- Hirase T, Staddon JM, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Itoh M, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S, Rubin LL (1997) Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J Cell Sci* 110:1603-1613
- Honda H, Pazin MJ, D'Souza T, Ji H, Morin PJ (2007) Regulation of the CLDN3 gene in ovarian cancer cells. *Cancer Biol Ther* 6:1733-1742
- Honda H, Pazin MJ, Ji H, Wernyj RP, Morin PJ (2006) Crucial roles of Sp1 and epigenetic modifications in the regulation of the CLDN4 promoter in ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 281:21433-21444

- Hou J, Gomes AS, Paul DL, Goodenough DA (2006) Study of claudin function by RNA interference. *J Biol Chem* 281:36117-36123
- Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S, Tsukita S (2005) Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol* 171:939-945
- Katahira J, Inoue N, Horiguchi Y, Matsuda M, Sugimoto N (1997) Molecular cloning and functional characterization of the receptor for *Clostridium perfringens* enterotoxin. *J Cell Biol* 136:1239-1247
- Katahira J, Sugiyama H, Inoue N, Horiguchi Y, Matsuda M, Sugimoto N (1997) *Clostridium perfringens* enterotoxin utilizes two structurally related membrane proteins as functional receptors in vivo. *J Biol Chem* 272:26652-26658
- Katoh M, Katoh M (2003) CLDN23 gene, frequently down-regulated in intestinal-type gastric cancer is a novel member of claudin gene family. *Int J Mol Med* 11:683-689
- Kausalya PJ, Amasheh S, Günzel D, Wurps H, Müller D, Fromm M, Hunziker W (2006) Disease-associated mutations affect intracellular traffic an paracellular Mg^{2+} transport function of claudin-16. *J Clin Invest* 116:878-891
- Kiuchi-Saishin Y, Gotoh S, Furuse M, Takasuga A, Tano Y, Tsukita S (2002) Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J Am Soc Nephrol* 13:875-886
- Kominsky SL, Tyler B, Sosnowski J, Brady K, Doucet M, Nell D, Smedley JG, McClane B, Brem H, Sukumar S (2007) *Clostridium perfringens* enterotoxin as a novel-targeted therapeutic for brain metastasis. *Cancer Res* 67:7977-7982
- Kominsky SL, Vali M, Korz D, Gabig TG, Weitzman SA, Argani P, Sukumar S (2004) *Clostridium perfringens* enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4. *Am J Pathol* 164:1627-1633
- Kostrewa D, Brockhaus M, D'Arcy A, Dale GE, Nelboeck P, Schmid G, Mueller F, Bazzoni G, Dejana E, Bartfai T, Winkler FK, Hennig M (2001) X-ray structure of junctional adhesion molecule: structural basis for homophilic adhesion via a novel dimerization motif. *Embo J* 20:4391-4398
- Koto T, Takubo K, Ishida S, Shinoda H, Inoue M, Tsubota K, Okada Y, Ikeda E (2007)

- Hypoxia disrupts the function of neural blood vessels through changes in the expression of claudin-5 in endothelial cells. *Am J Pathol* 170:1389-1397
- Krug SM, Amasheh S, Richter JF, Milatz S, Günzel D, Westphal JK, Huber O, Schulzke JD, Fromm M (2009) Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. *Mol Biol Cell* 20:3713-3724
- Krug SM, Fromm M, Günzel D (2009) Two-path impedance spectroscopy for measuring paracellular and transcellular epithelial resistance. *Biophys J* 97:2202-2211
- Leach L, Lammiman MJ, Babawale MO, Hobson SA, Bromilou B, Lovat S, Simmonds MJ (2000) Molecular organization of tight and adherens junctions in the human placental vascular tree. *Placenta* 21:547-557
- Liebner S, Fischmann A, Rascher G, Duffner F, Grote EH, Kalbacher H, Wolburg H (2000) Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol* 100:323-331
- Liebner S, Kniesel U, Kalbacher H, Wolburg H (2000) Correlation of tight junction morphology with the expression of tight junction proteins in blood-brain barrier endothelial cells. *Eur J Cell Biol* 79:707-717
- Lievano S, Alarcon B, Chavez-Munguia B, Gonzalez-Mariscal L (2006) Endothelia of term human placentae display diminished expression of tight junction proteins during preeclampsia. *Cell Tissue Res* 324:433-448
- Lippoldt A, Liebner S, Andbjør B, Kalbacher H, Wolburg H, Haller H, Fuxe K (2000) Organization of choroid plexus epithelial and endothelial cell tight junctions and regulation of claudin-1, -2 and -5 expression by protein kinase C. *Neuroreport* 11:1427-1431
- Long H, Crean CD, Lee WH, Cummings OW, Gabig TW (2001) Expression of *Clostridium perfringens* enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in prostate cancer epithelium. *Cancer Res* 61:7878-7881
- Lu KH, Patterson AP, Wang L, Marquez RT, Atkinson EN, Baggerly KA, Ramoth LR, Rosen DG, Liu J, Hellstrom I, Smith D, Hartmann L, Fishman D, Berchuck A, Schmandt R, Whitaker R, Gershenson DM, Mills GB, Bast RC Jr (2004) Selection of potential markers for epithelial ovarian cancer with gene expression arrays and recursive descent partition analysis. *Clin Cancer Res* 10:3291-3300

- Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E (1998) Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 142:117-127
- Matsuda Y, Semba S, Ueda J, Fuku T, Hasuo T, Chiba H, Sawada N, Kuroda Y, Yokozaki H (2007) Gastric and intestinal claudin expression at the invasive front of gastric carcinoma. *Cancer Sci* 98:1014-1019
- McCarthy M, Skare IB, Stankewich MC, Furuse M, Tsukita S, Rogers RA, Lynch RD, Schneeberger EE (1996) Occludin is a functional component of the tight junction. *J Cell Sci* 109:2287-2298
- Michikawa H, Fujita-Yoshigaki J, Sugiya H (2008) Enhancement of barrier function by overexpression of claudin-4 in tight junctions of submandibular gland cells. *Cell Tissue Res* 334:255-264
- Miyamoto T, Morita K, Takemoto D, Takeuchi K, Kitano Y, Miyakawa T, Nakayama K, Okamura Y, Sasaki H, Miyachi Y, Furuse M, Tsukita S (2005) Tight junctions in Schwann cells of peripheral myelinated axons: a lesson from claudin-19-deficient mice. *J Cell Biol* 169:527-538
- Morin PJ (2005) claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res* 65:9603-9606
- Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S (1999) Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci* 96:511-516
- Morita K, Furuse M, Yoshida Y, Itoh M, Sasaki H, Tsukita S, Miyachi Y (2002) Molecular architecture of tight junctions of periderm differs from that of the maculae occludentes of epidermis. *J Invest Dermatol* 118:1073-1079
- Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S (1999) Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Biol* 147:185-194
- Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, Furuse M, Tsukita S (2003) Size-selective loosening of the blood-brain-barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol* 161:653-660
- Nunes FD, Lopez LN, Lin HW, Davies C, Azevedo RB, Gow A, Kachar B (2006) Distinct

- subdomain organization and molecular composition of a tight junction with adherens junction features. *J Cell Sci* 119:4819-4827
- Palmeri D, Van Zante A, Huang C, Hemmerich S, Rosen SD (2000) Vascular endothelial junction-associated molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily, is localized to intercellular boundaries of endothelial cells. *J Biol Chem* 275:19139-19145
- Piontek J, Winkler L, Wolburg H, Müller SL, Zuleger N, Piehl C, Wiesner B, Krause G, Blasig IE (2008) Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *FASEB J* 22:146-158
- Rahner C, Mitic LL, Anderson JM (2001) Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. *Gastroenterology* 120:411-422
- Richardson JC, Scalera V, Simmons NL (1981) Identification of two strains of MDCK cells which resemble separate nephron tubule segments. *Biochem Biophys Acta* 673:26-36
- Saitou M, Fujimoto K, Doi Y, Itoh M, Fujimoto T, Furuse M, Takano H, Noda T, Tsukita S (1998) Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol* 141:397-408
- Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, Noda T, Tsukita S (2000) Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* 11:4131-4142
- Santin AD, Bellone S, Siegel ER, McKenney JK, Thomas M, Roman JJ, Burnett A, Tognon G, Bandiera E (2007) Overexpression of *Clostridium perfringens* enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in uterine carcinosarcomas. *Clin Cancer Res* 13:3339-3346
- Santin AD, Zhan F, Bellone S, Palmieri M, Cane S, Bignotti E, Anfossi S, Gokden M, Dunn D, Roman JJ, O'Brien TJ, Tian E, Cannon MJ, Shaughnessy J Jr, Pecorelli S. (2004) Gene expression profiles in primary ovarian serous papillary tumors and normal ovarian epithelium: identification of candidate molecular markers for ovarian cancer diagnosis and therapy. *Int J Cancer* 112:14-25
- Sasaki H, Matsui C, Furuse K, Mimori-Kiyosue Y, Furuse M, Tsukita S (2003) Dynamic behavior of paired claudin strands within apposing plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:3971-3976
- Satake S, Semba S, Matsuda Y, Usami Y, Chiba H, Sawada N, Kasuga M, Yokozaki H

- (2008) CDX2 transcription factor regulates claudin-3 and claudin-4 expression during intestinal differentiation of gastric carcinoma. *Pathol Int* 58:156-63
- Scheurer SB, Rybak JN, Rösli C, Neri D, Elia G (2004) Modulation of gene expression by hypoxia in human umbilical vein endothelial cells: A transcriptomic and proteomic study. *Proteomics* 4:1737-1760
- Schulzke JD, Gitter AH, Mankertz J, Spiegel S, Seidler U, Amasheh S, Saitou M, Tsukita S, Fromm M (2005) Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* 1669:34-42
- Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J, McCredie D, Milford D, Sanjad S, Lifton RP (1999) Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg^{2+} resorption. *Science* 285:103-106
- Staehelin LA (1973) Further observations in the fine structure of freeze-cleaved tight junctions. *J Cell Sci* 13:763-786
- Stevenson BR, Anderson JM, Goodenough DA, Mooseker MS (1988) Tight junction structure and ZO-1 content are identical in two strains of Madin-Darby canine kidney cells which differ in transepithelial resistance. *J Cell Biol* 107:2401-2408
- Taddei A, Giampietro C, Conti A, Orsenigo F, Breviario F, Pirazzoli V, Potente M, Daly C, Dimmeler S, Dejana E (2008) Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nat Cell Biol* 10:923-934
- Takala H, Saarnio J, Wiik H, Soini Y (2007) Claudins 1, 3, 4, 5 and 7 in esophageal cancer: loss of claudin 3 and 4 expression is associated with metastatic behavior. *APMIS* 115:838-847
- Tokes AM, Kulka J, Paku S, Szik A, Paska C, Novak PK, Szilak L, Kiss A, Bögi K, Schaff Z (2005) Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. *Breast Cancer Res* 7:R296-305
- Tsukita S, Furuse M (1999) Occludin and claudins in tight junction strands: leading or supporting players? *Trends Cell Biol* 9:268-273
- Turksen K, Troy T (2004) Barriers built on claudins. *J Cell Sci* 117:2435-2447
- Van Itallie CM, Fanning AS, Anderson JM (2003) Reversal of charge selectivity in cation or

- anion-selective epithelial lines by expression of different claudins. *Am J Physiol Renal Physiol* 285:F1078-1084
- Van Itallie CM, Gambling TM, Carson JL, Anderson JM (2005) Palmitoylation of claudins is required for efficient tight-junction localization *J Cell Sci* 118:1427-1436
- Van Itallie CM, Rahner C, Anderson JM (2001) Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest* 107:1319-1327
- Van Itallie CM, Rogan S, Yu A, Vidal LS, Holmes J, Anderson JM (2006) Two splice variants of claudin-10 in the kidney create paracellular pores with different ion selectivities. *Am J Physiol Renal Physiol* 291:F1288-1299
- Wessells H, Sullivan CJ, Tsubota Y, Engel KL, Kim B, Olson NE, Thorner D, Chitaley K (2009) Transcriptional profiling of human cavernosal endothelial cells reveals distinctive cell adhesion phenotype and role for claudin-11 in vascular barrier function. *Physiol Genomics* 39:100-108
- Wolburg H, Noell S, Mack A, Wolburg-Buchholz K, Fallier-Becker P (2009) Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res* 335:75-96
- Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Kraus J, Rascher-Eggstein G, Liebner S, Hamm S, Duffner F, Grote E, Risau W, Engelhardt B (2003) Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol* 105:586-592
- Yu ASL, McCarthy KM, Francis SA, McCormack JM, Lai J, Rogers RA, Lynch RD, Schneeberger EE (2005) Knock down of occludin expression leads to diverse phenotypic alterations in epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 288:C1231–C1241
- Zeissig S, Bürgel N, Günzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, Kroesen AJ, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD (2007) Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* 56:61-72

Verzeichnis der eigenen Publikationen

- Amasheh S*, **Milatz S*** (*shared first authorship), Krug SM, Bergs M, Amasheh M, Schulzke JD, Fromm M (2009) Na⁺ absorption defends from paracellular back-leakage by claudin-8 up-regulation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 378: 45–50.
- Amasheh S, **Milatz S**, Krug SM, Markov AG, Günzel D, Amasheh M, Fromm M (2009) Tight junction proteins as channel formers and barrier builders: claudin-2, -5, and -8. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1165: 211–219.
- Günzel D, Haisch L, Pfaffenbach S, Krug SM, **Milatz S**, Amasheh S, Hunziker W, Müller D (2009) Claudin function in the thick ascending limb of Henle's loop. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1165: 152–162.
- Krug SM, Amasheh S, Richter JF, **Milatz S**, Günzel D, Westphal JK, Huber O, Schulzke JD, Fromm M (2009) Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. *Mol. Biol. Cell* 20: 3713–3724.
- Markov AG, Veshnyakova A, Krug SM, **Milatz S** (2007) Expression of tight junction proteins in the epithelium of small intestine of the rat. *Russ. J. Physiol. (Ross. Fiziol. Zh. Im. I. M. Sechenova)* 93(9): 1043–1054.
- Rosenthal R, **Milatz S**, Krug SM, Oelrich B, Schulzke JD, Amasheh S, Günzel D, Fromm M. The tight junction protein claudin-2 forms a paracellular water channel. *J. Cell Sci.* [31.08.09: eingereicht; 09.11.09: positive Reviews]
- **Milatz S**, Krug SM, Rosenthal R, Günzel D, Schulzke JD, Amasheh S*, Fromm M*. Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions. [in Vorbereitung]

Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Prof. Dr. Michael Fromm für die Bereitstellung des Forschungsthemas und für die Möglichkeit, diese Arbeit im Institut für Klinische Physiologie anfertigen zu können. Seine ausgezeichnete Betreuung und uneingeschränkte Förderung haben diese Forschungsarbeit erst ermöglicht.

Ferner danke ich Prof. Dr. Detlev Krüger und Prof. Dr. Otmar Huber für die Übernahme der gutachterlichen Tätigkeit.

Dem gesamten Labor Klinische Physiologie/Gastroenterologie danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit, wobei ich einige Kollegen/innen besonders hervorheben möchte:

Zunächst möchte ich mich bei PD Dr. Salah Amasheh bedanken, der nicht nur durch seine fachliche Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat, sondern dessen Optimismus mich nach so manchem frustrierenden Experiment neu motiviert hat. PD Dr. Dorothee Günzel danke ich herzlich für ihr Engagement bei zahlreichen elektrophysiologischen Fragestellungen sowie ihre vielen wertvollen Ideen und Ratschläge. Bei Dr. Rita Rosenthal möchte ich mich für die enge Zusammenarbeit bei der Messung der Wasser-Permeabilität und ganz besonders für ihre persönliche Unterstützung bedanken. Ein besonderer Dank gilt auch Susanne Krug für ihre Zusammenarbeit bei der Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie und der Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie sowie ihre vielen wissenschaftlichen Anregungen. Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke und Dr. Jan Richter danke ich für die zahlreichen wissenschaftlichen Beiträge und Ratschläge. Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Anja Fromm für die hervorragende technische Assistenz und ihre zahlreichen Ratschläge bei methodischen Fragestellungen sowie bei Detlef Sorgenfrei für die Unterstützung bei technischen Problemen aller Art bedanken.

Mein besonderer Dank gilt auch Dr. Andreas Zakrzewicz vom Institut für Physiologie, Campus Benjamin Franklin der Charité Berlin, für die sehr gute Kooperation im Rahmen des HUVEC-Projektes und die konstruktiven wissenschaftlichen Diskussionen.

Ferner danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft sowie der Sonnenfeld-Stiftung Berlin für die finanzielle Förderung und besonders Prof. Dr. Dr. h.c. Hansjürgen Freiherr von Villiez für sein stetes Interesse am Fortgang der Forschungsarbeit.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mich in jeder Hinsicht gefördert und unterstützt haben. Bei meiner gesamten Familie und meinen Freunden, vor allem bei Torsten Huber und Heiko Milatz, möchte ich mich ganz besonders herzlich für ihr Interesse und ihr Verständnis bedanken.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, 16.12. 2009

Susanne Milatz